

# **Freie und immobilisierte (R)-Oxynitrilase: Charakterisierung und Herstellung von chiralen Cyanhydrinen**

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von

**Emine Capan**  
aus Karakocan / Türkei

1. Referent: Prof. Dr. K.-D. Vorlop  
2. Referent: apl. Prof. Dr. S. Lang  
eingereicht am: 16.08.2004  
mündliche Prüfung am: 22.12.2004  
Druckjahr: 2005



## Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

G. Czichocki, H. Dautzenberg, E. Capan, Vorlop K-D: New and effective entrapment of polyelectrolyte-enzyme-complexes in LentiKats<sup>®</sup>. *Biotechnology letters* 23 (16): 1303-1307 2001

H. Gröger, E. Capan, A. Barthuber, K-D. Vorlop: Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels; *Organic letters* 3 (13): 1969-1972 2001

### Tagungsbeiträge

E. Capan, U. Jahnz, K-D. Vorlop: Pre-activated LentiKats<sup>®</sup> TM-hydrogels for covalent binding of enzymes; *Landbauforsch Völkenrode SH*, 241:151-153, 2002

E. Capan, U. Jahnz, K-D. Vorlop: Pre-activated LentiKat<sup>®</sup>-hydrogels for covalent binding of enzymes. In: *COST 840: Workshop 'Practical Aspects of Encapsulation Technologies'*; 12.-14.10.2001, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Institute of Technology and Biosystems Engineering Braunschweig, Germany. Braunschweig: FAL, 30 2001

E. Capan, K-D. Vorlop: Industrial production of (R)-cyanohydrins by using entrapment (R)-oxynitrilase; In: *Fessner W-D (ed) BioTrans 2001: the 5th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, September 2nd - 7th at the TU Darmstadt; abstracts of lectures, abstracts of posters, list of participants. Darmstadt: Techn Univ, Inst f Organische Chemie, 209 2001 [Abstract]*

H. Gröger, E. Capan, A. Barthuber, K-D. Vorlop: Biocatalytic asymmetric hydricyana-tion in the presence of (R)-oxynitrilases entrappes in lens-shaped gels. *Landbau-forsch Völkenrode SH* 241: 87-91 2002

H. Gröger, E. Capan, A. Barthuber, K-D. Vorlop: Biocatalytic asymmetric hydrocyanation in the presence of (R)-oxynitrilases entrapped in lens-shaped gels. *In: COST 840: Workshop 'Practical Aspects of Encapsulation Technologies': 12.-14.10.2001, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Institute of Technology and Biosystems Engineering Braunschweig, Germany. Braunschweig: FAL, 15 2001*

K-D. Vorlop, E. Capan, H. Dautzenberg, G. Czichocki: Novel and effective entrapment of polyelectrolyte-enzyme-complexes in LentiKats. *In: IX International BRG Workshop and 62th ICB Seminar on Bioencapsulation in Biomedical, Biotechnological and Industrial Applications: COST 840 'Bioencapsulation, Innovations and Technologies', Management Committee Meeting, Working Group Meetings; Warsaw, May 11-13. 2001. Warsaw: IBIB PAN, p P 2 2001*

#### **Patente**

H. Gröger, K-D. Vorlop, E. Capan: Method for producing optically active cyanhydrins; *EP 200011743 2001*

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Cyanhydrinsynthese</b>	<b>7</b>
3.1.1	Nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese	8
3.1.2	Enzymatische Cyanhydrinsynthese	12
3.1.2.1	Kinetische Racematspaltung mit Lipasen und Esterasen	12
3.1.2.2	(R)-Oxynitrilase katalysierte Synthese von (R)-Cyanhydrinen	14
3.1.2.2.1	Synthese in wässrigen Systemen	16
3.1.2.2.2	Synthese in organischen Lösungsmitteln	17
<b>3.2</b>	<b>Immobilisierung von Biokatalysatoren</b>	<b>18</b>
3.2.1	Immobilisierungsmethoden	19
3.2.1.1	Immobilisierung durch Kopplung	20
3.2.1.1.1	Trägerbindung	20
3.2.1.1.2	Quervernetzung	21
3.2.1.2	Immobilisierung durch Einschluss	21
3.2.1.2.1	Membranabtrennung	21
3.2.1.2.2	Matrixeinhüllung	22
3.2.2	Polyvinylalkohol als Immobilisierungsmatrix	22
3.2.2.1	Polyvinylalkohol	22
3.2.2.2	Hydrogele aus Polyvinylalkohol	23
3.2.2.3	Linsenförmige PVA Hydrogelpartikel-LentiKats®	26
3.2.3	Immobilisierungsmethoden für (R)-Oxynitrilase	27
3.2.4	Industrielle Verfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren	28
<b>3.3</b>	<b>Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen</b>	<b>30</b>
3.3.1	Ein-Substrat-Kinetik	30
3.3.2	Zwei-Substrat-Kinetik	31
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>33</b>

<b>4.2</b>	<b>Aufbau der Versuchsanlage</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Enzymkatalysierte Synthese und Spaltung von (R)-Cyanhydrin</b>	<b>35</b>
4.3.1	Aktivitätstest der Cyanhydrinsynthese mit dem freien Enzym (SIGMA-, ROCHE- und AAS- Enzym)	36
4.3.2	Aktivitätstest der Cyanhydrinspaltung mit dem freien Enzym (SIGMA-, ROCHE- und AAS- Enzym)	37
<b>4.4</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>37</b>
4.4.1	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd	38
4.4.1.1	Offline-Messung	38
4.4.1.2	Online-Messung	39
4.4.2	Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd und Mandelonitril mittels Gaschromatographie	43
4.4.3	Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd und Mandelonitril mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	44
4.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
<b>4.5</b>	<b>Kinetische Untersuchung</b>	<b>46</b>
4.5.1	Einfluss der Benzaldehydkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit	46
4.5.2	Einfluss der Kaliumcyanidkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit	47
4.5.3	Einfluss der Konzentration des Produktes (R)-Mandelonitril auf die Reaktionsgeschwindigkeit	48
<b>4.6</b>	<b>Immobilisierung von (R)-Oxynitrilase</b>	<b>48</b>
4.6.1	Einfluss von Glutardialdehyd auf die Enzymaktivität	49
4.6.2	Einfluss des Chitosans auf die Enzymaktivität	49
4.6.3	Coquervernetzung des Enzyms durch Chitosan und Glutardialdehyd	50
4.6.4	Einschluss des molekulargewichtsvergrößerten Enzyms in Polyvinylalkohol	50
4.6.5	Herstellung von LentiKats®	51
4.6.5.1	Herstellung mit Spritze und Kanüle	51
4.6.5.2	Herstellung von LentiKats® mit dem LentiKat®Printer	52
4.6.5.3	Funktionsprinzip des LentiKat®Printers	53
4.6.5.4	Nachbereitung der LentiKats®	53
<b>4.7</b>	<b>Ideale Immobilisierungsmethode für (R)-Oxynitrilase</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Enzymatische und nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese</b>	<b>58</b>

---

5.1.1	Nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese	58
5.1.2	Racemisierung des chiralen Cyanhydrins	60
5.1.3	Enzymatische Cyanhydrinsynthese	62
<b>5.2</b>	<b>Variation der Cyanidquelle</b>	<b>63</b>
<b>5.3</b>	<b>Variation von Enzymquellen</b>	<b>66</b>
<b>5.4</b>	<b>Kinetische Untersuchung der enzymatischen Cyanhydrinsynthese</b>	<b>73</b>
5.4.1	Einfluss der Substratkonzentration	73
5.4.1.1	Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung auf Zwei-Substrat- Reaktionen	74
5.4.1.2	Variation der Kaliumcyanidkonzentration	76
5.4.1.3	Variation der Benzaldehydkonzentration	81
5.4.2	Einfluss der Produktkonzentration	84
5.4.3	Mechanismus der enzymatischen Cyanhydrinsynthese	85
<b>5.5</b>	<b>Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase</b>	<b>90</b>
5.5.1	Einschluss von Mandelkernkleie in PVA-Hydrogele	91
5.5.2	Flockulation des Enzyms mit Polyelektrolyten	93
5.5.3	Quervernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd	94
5.5.4	Coquervernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd und Chitosan	96
5.5.5	Einschluss des coquervernetzten Enzyms in PVA-Hydrogele	100
5.5.6	Langzeit-Stabilität des immobilisierten Enzyms	101
<b>5.6</b>	<b>Einfluss der Enzymbeladung auf die Enzymaktivität</b>	<b>105</b>
<b>5.7</b>	<b>Abschätzung des zu erwartenden Katalysatorwirkungsgrades</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>131</b>
8.1	Abkürzungen	131
8.2	Technische Daten	132





# 1 Einleitung

Die Chiralität (griechisch cheir = die Hand) wurde vor 150 Jahren von Louis Pasteur entdeckt. Ihr Wert für die Industrie wurde jedoch erst in den vergangenen 50 Jahren erkannt. Heute erlangt sie in immer größeren Bereichen der Industrie und der Feinchemie Bedeutung. Das Marktvolumen allein für enantiomerenreine Pharmazeutika lag schon 1995 bei 59 Mrd. US \$ [1]. Im Jahre 2000 waren 75% aller Arzneiwirkstoffe auf dem Markt enantiomerenrein [2]. Es gibt vier grundlegende Ansätze für den Aufbau optisch reiner Verbindungen.

- Geht man von achiralen oder racemischen Edukten aus, kann im Verlauf oder am Ende einer Synthese eine Racematspaltung durchgeführt werden.
- Ein zweiter Weg ist die Verwendung enantiomerenreiner Naturstoffe (engl.: chiral pool), von denen ausgehend jedes Stereozentrum in der richtigen Beziehung zu den bestehenden eingeführt wird.
- Die dritte Möglichkeit besteht in der Verwendung eines chiralen Auxiliars, das kovalent an das prochirale Edukt gebunden ist und die Entstehung neuer Chiralitätszentren steuert. Wird das Auxiliar nicht mehr benötigt, kann es abgespalten und zurück gewonnen werden.
- Einen anderen Weg ist der Einsatz chiraler Katalysatoren (z.B. Enzyme oder metallorganische Komplexe). Diese Katalysatoren können eine hohe Enantioselectivität bewirken, indem sie durch diastereomere Zwischenprodukte oder Übergangszustände die Bildung eines Enantiomers beschleunigen.

Industriell werden bereits viele chirale Verbindungen nach diesen Verfahren hergestellt. In diesem Umfeld bieten die chiralen Cyanhydrine ein enormes Potential als optisch aktive Synthesebausteine für weiterführende Verbindungen [3]. Die Abbildung 1-1 zeigt die Vielseitigkeit von Cyanhydrinen, die durch Reaktion an der Nitril- oder Hydroxylgruppe z.B. in optisch aktive  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren [3-8],  $\alpha$ -Hydroxyester [4],  $\alpha$ -Hydroxyaldehyde [3-4, 9-11], Acryloine [12-13] bzw. 1,2-Diole und 2-Aminoalkohole [14-18] transformiert werden können.

Optisch aktive  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren dienen wiederum als Zusatzstoffe für Futtermittel oder werden zur Gewinnung von pharmazeutischen Wirkstoffen und Vitaminen

eingesetzt [19]. Weiterhin lassen sich diese Carbonsäuren auch vorteilhaft in die sonst nur sehr schwer zugänglichen N-substituierten chiralen  $\alpha$ -Aminosäuren überführen [20].

Die aus Cyanhydrinen abgeleiteten  $\alpha$ -Aminoalkohole werden in der Wirkstoffsynthese eingesetzt. Sie finden z.B. als Herz-Kreislauf Therapeutika und als Antiasthmatica Verwendung [21].

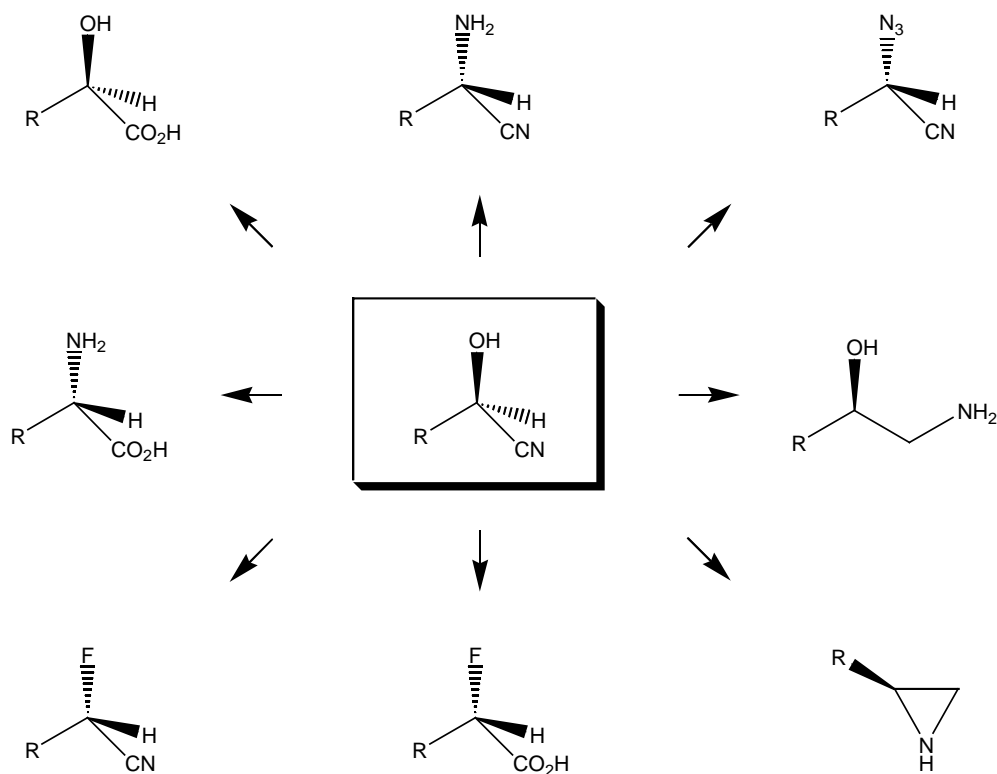


Abbildung 1-1: Synthetische Vielfalt enantiomerenreiner Cyanhydrine [3, 133, 134]

Diese Beispiele erklären das Interesse und ständige Bemühen, Verfahren zur Synthese von chiralen Cyanhydrinen zu entwickeln.

Die wichtigsten nichtenzymatischen katalytischen Methoden zur Synthese von Cyanhydrinen sind die Addition von Blausäure an Carbonylverbindungen in Gegenwart von Peptiden oder enantiomerenreiner metallorganischer Katalysatoren, wobei in diesem Fall hauptsächlich chirale Titankomplexe eingesetzt werden [22].

Eine Alternative ist die enzymkatalysierte Cyanhydrinsynthese. Das bereits im Jahre 1908 von ROSENTHALER [23] beschriebene und 1963 von BECKER und PFEIL [6, 24] erstmals aus Bittermandeln isolierte und charakterisierte Enzym (R)-Oxynitrilase [E.C. 4.1.2.10] katalysiert die enantioselektive Blausäureaddition an Aldehyde. Dies ermöglicht so einen einfachen Zugang zu chiralen Cyanhydrinen.

Zwar konnte mit (R)-Oxynitrilase bereits ein breites Spektrum optisch aktiver (R)-Cyanhydrine hergestellt werden, doch blieben die Ausbeuten an dem gewünschten Enantiomer in wässrigem Reaktionsmedium lange Zeit unbefriedigend. Die geringe optische Reinheit der Cyanhydrine ist dabei auf eine parallel ablaufende nichtenzymatische Reaktion zurückzuführen, die zu racemischen Verbindungen führt. Neuere Untersuchungen ergaben, dass diese unerwünschte Nebenreaktion verhindert werden kann, wenn die Reaktion bei niedrigen pH-Werten durchgeführt wird. Das Arbeiten in wässrigen Pufferlösungen bei niedrigen pH-Werten gilt in der Literatur als eingehend untersucht [25, 136, 137].

Ein Großteil der kommerziell interessanten Aldehyde und Ketone ist in wässrigen Medien schlecht löslich oder instabil und konnten daher bislang keine rentable Anwendung finden. Dieses Problem kann dadurch gelöst werden, dass die enzymatische Reaktion in Gegenwart organischer Lösungsmittel durchgeführt wird [26]. Im Zwei-Phasen-System ist das Enzym in der wässrigen Phase gelöst und von einer wasserunlöslichen organischen Phase umgeben. Auf diese Weise können sowohl bessere Löslichkeiten der Substrate als auch höhere optische Reinheiten erzielt werden. Man muss jedoch dafür in Kauf nehmen, dass die Enzymaktivität und die Enzymstabilität unter diesen Bedingungen deutlich schlechter sind als im rein wässrigen Milieu [26].

Dem technischen Einsatz der isolierten (R)-Oxynitrilase steht im Allgemeinen ihr hoher Preis, ihre geringe Langzeitstabilität sowie die Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung und Wiederverwendung entgegen.

Bereits sehr früh wurden die Vorteile einer Immobilisierung auch für das Enzym (R)-Oxynitrilase erkannt. Die Immobilisierung führt zu einer Verlagerung der katalytischen Aktivität von submikroskopisch und mikroskopisch kleinen Einheiten in makroskopisch erfassbare Partikel, um eine Rückhaltung zu erreichen [27].

Die Immobilisierung ermöglicht damit zum einen den wiederholten Einsatz des Biokatalysators. Insbesondere bei teuren Enzymen, wie im Falle der (R)-Oxynitrilase, kann dadurch der relative Anteil der Enzymkosten an den Gesamtkosten gesenkt werden. Zum anderen erlaubt die Immobilisierung eine kontinuierliche Prozessführung mit hoher Biokatalysatordichte, ein bei industriellen Prozessen sehr wichtiges Kriterium.

Die einzelnen Immobilisierungsmethoden weisen eine Vielzahl von Varianten auf, deren Eignung für eine bestimmte Zielsetzung empirisch ermittelt werden muss. Die Methoden umfassen physikalische und chemische Methoden sowie ihre Kombinationen. Ein guter Überblick über die Immobilisierung von Enzymen ist bei HARTMEIER [27] zu finden.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Immobilisierungsmethode für das Enzym (R)-Oxynitrilase entwickelt werden, die möglichst folgende Vorteile aufweist:

- hohe Langzeitstabilität und -aktivität des Enzyms (hohe „Turnover Numbers“ (TON) der Cyanhydrin-Synthese durch hohe Wiederverwendbarkeit des enzymatischen Systems)
- hohe Enantioselektivität (> 99 %)
- minimale Kosten der Immobilisierung
- kein Katalysatorleaching
- einfache Immobilisierungstechnik
- hohe mechanische Stabilität und große Elastizität des immobilisierten Systems
- einfache Abtrennung makroskopischer (> 1 mm) Enzym-Komponenten
- definierte Partikelgröße des immobilisierten Systems

Die Aktivität und die Enantioselektivität des freien und des immobilisierten Enzyms sollen in einem Puffersystem hinsichtlich folgender Punkte optimiert werden:

- Optimierung der Reaktionsbedingungen
- Ermittlung der kinetischen Konstanten
- Optimierung der Immobilisierung
- Übertragung der vorhergehenden Ergebnisse auf das immobilisierte System

Abschließend soll dieses optimierte Biokatalysatorsystem auf seine Eignung im Zwei-Phasen-System untersucht werden.



### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Cyanhydrinsynthese

Optisch aktive Cyanhydrine bieten ein sehr großes Synthesepotential. Sie können leicht in  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren [3-8],  $\alpha$ -Hydroxyester [4],  $\alpha$ -Hydroxyaldehyde [3-4, 9-11], Acrolein [12-13] bzw. Diole und 1,2-Aminoalkohole [14-18] umgewandelt werden, von denen eine große Zahl pharmazeutisch und biologisch aktiv ist.

Zwar konnte mit (R)-Oxynitrilase ((R)-Mandelonitrilase) bereits ein breites Spektrum optisch aktiver (R)-Cyanhydrine dargestellt werden, doch sind die Ausbeuten des gewünschten Enantiomers im wässrigen Reaktionsmedium unbefriedigend. Die geringe optische Reinheit der Cyanhydrine ist dabei auf eine parallel ablaufende nichtenzymatische Reaktion zurückzuführen, die zum racemischen Produkten führt (Abbildung 3-1).

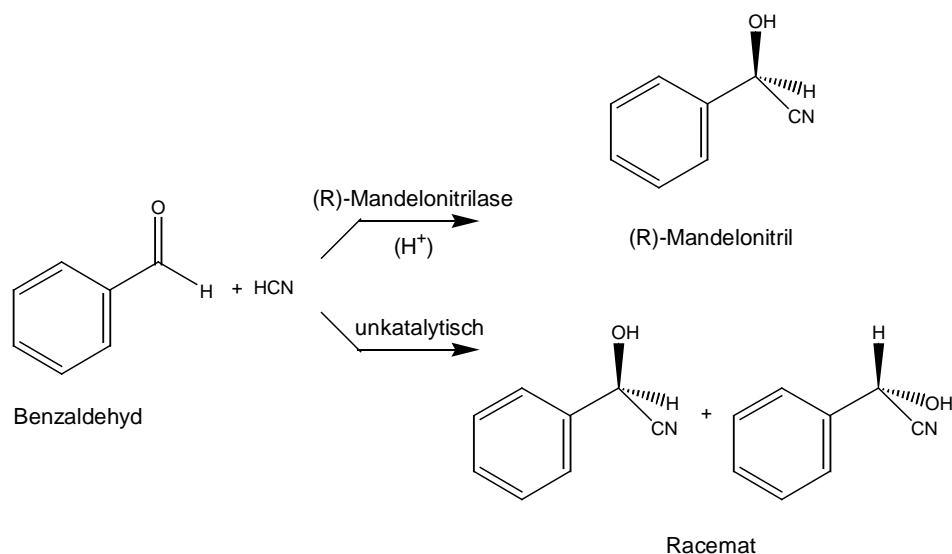


Abbildung 3-1: Enzymatische und spontane Cyanhydrinsynthese

Da es bei diesem Reaktionstyp immer zu einer Konkurrenzreaktion zwischen enzymatischer und spontaner Reaktion kommt, ist es erforderlich, ein Reaktionssystem zu finden, in dem die enzymatische Reaktion abläuft, während die spontane Reaktion neben der enzymatischen Reaktion zu vernachlässigen ist.

### 3.1.1 Nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese

Aufschlussreiche Hinweise über die Addition von Blausäure an Benzaldehyd ohne Anwesenheit des Enzyms konnten aus mechanistischen Arbeiten zur Cyanhydrinbildung aus folgenden Artikeln erhalten werden [28-30]. Hiernach verläuft die chemische Addition von Blausäure an Carbonylverbindungen im wässrigen System unter schwach sauren Bedingungen proportional zu den Substratkonzentrationen gemäß einer Reaktionskinetik 2. Ordnung. Dabei wird folgender Reaktionsablauf diskutiert:

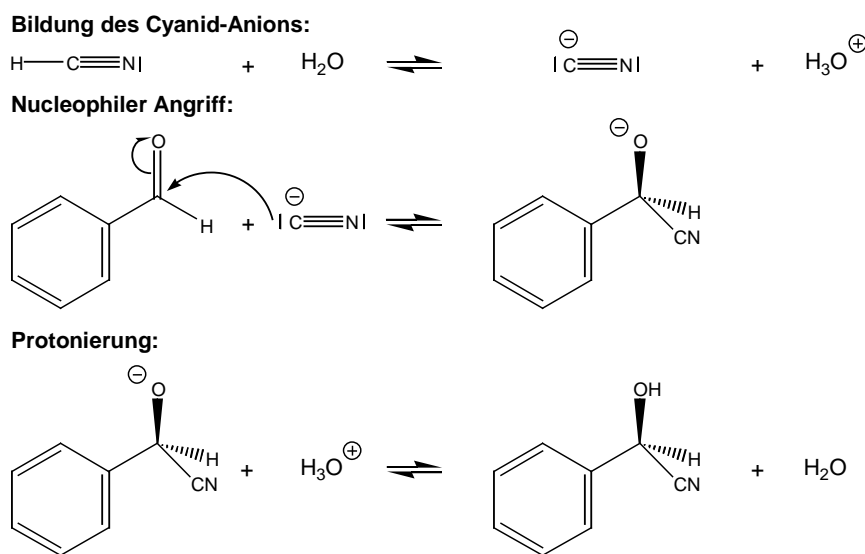


Abbildung 3-2: Reaktionsmechanismus der chemischen Cyanhydrinsynthese

Die Reaktion ist, wie aus dem Mechanismus hervorgeht, in drei Phasen unterteilt, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt der nukleophile Angriff auf den positiv polarisierten Carbonylkohlenstoff ist. Die beiden anderen Schritte erfolgen schnell.

Da die eigentliche Reaktion nicht von der Blausäure, sondern vom Cyanid-Anion ausgeht, ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung pH abhängig. Laut Literatur [28-30] verläuft die Cyanhydrinsynthese im schwach sauren Medium am schnellsten. Verlangsamt ist sie im acideren Medium. Nahezu kein Umsatz ist im alkalischen Bereich feststellbar. Hier liegt die Blausäure zwar vollständig deprotoniert vor, doch aufgrund der höheren Affinität des Hydroxydions zum Benzaldehyd, reagieren die  $\text{OH}^-$ -Ionen gegenüber den Cyanidionen bevorzugt mit dem Aldehyd. Es kommt zur



Disproportionierung des Benzaldehyds zu Säure und Alkohol (CANNIZZARO-Oxidation-Reduktion). Dieser Mechanismus wird im Folgenden näher erläutert.

Bei Aldehyden, die in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe kein Wasserstoffatom besitzen, tritt als Nebenreaktion im wässrigen alkalischen Milieu die CANNIZZARO-Reaktion auf. Die halbe Menge des Aldehyds wird zum primären Alkohol reduziert, die andere Hälfte zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert (Abbildung 3-3).

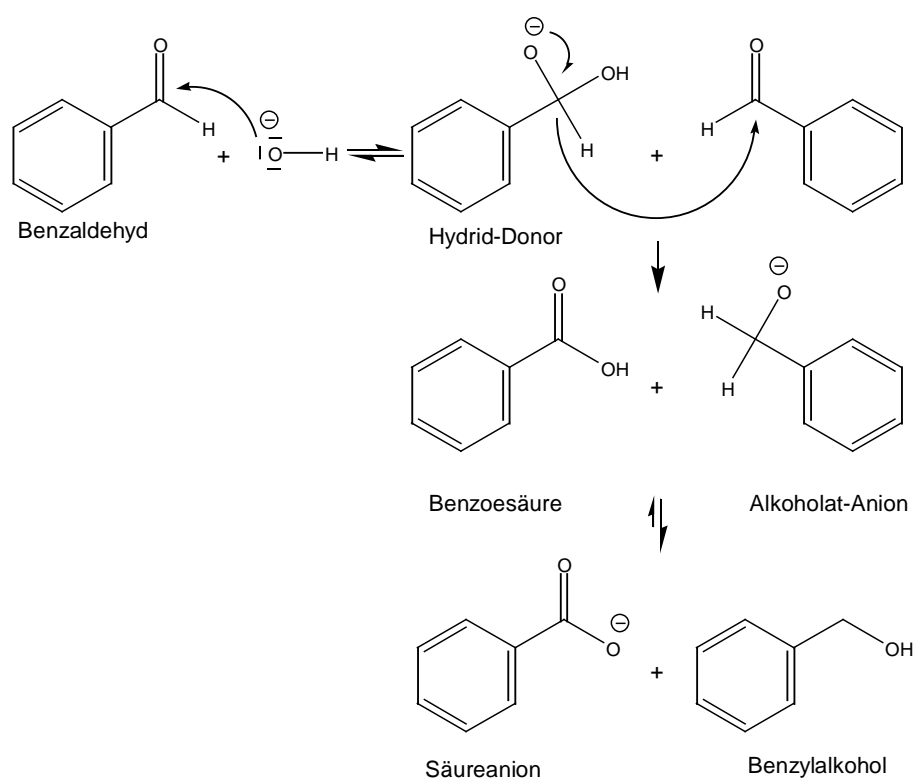


Abbildung 3-3: CANNIZZARO-Reaktion am Beispiel von Benzaldehyd

Der Reaktionsmechanismus der CANNIZZARO-Reaktion (Abbildung 3-3) beginnt mit der Addition des Hydroxydanions an die Carbonylgruppe. Dieser Schritt erfolgt schnell und reversibel. Die Übertragung des Hydridions ist der geschwindigkeitsbestimmende Folgeschritt. Anschließend wird ein Wasserstoffatom zwischen dem Alkoholat und der Carbonsäure ausgetauscht.

Bereits in den fünfziger Jahren untersuchten mehrere Arbeitsgruppen (ALBERTS; PRELOG und WILHELM; HUSTEDT und PFEIL) den Einfluss chiraler Basen, insbesondere von

China-Alkaloiden, auf die asymmetrische Addition von Blausäure an Aldehyde [28-30]. Allerdings konnte bei diesen Untersuchungen die Enantioselektivität nicht ermittelt werden, da der absolute Drehwert dieser Verbindungen nicht bekannt war.

TSUBOYAMA [31] erhielt beim Einsatz eines (S)-Isobutylethylenimin-Polymers optisch aktives Benzaldehydcyanhydrin mit einem ee-Wert unter 20%. Durch den Einsatz von  $\beta$ -Cyclodextrin-Aldehyd-Komplexen [32] wurden Enantiomerenüberschüsse von nicht mehr als 32% erreicht. Auch durch die Verwendung eines von Ephedrin abgeleiteten chiralen Phasentransfer-Katalysators brachte keine große Verbesserung [33].

Cyanhydrine mit höherer optischer Reinheit erhielten INOUE und Mitarbeiter durch den Einsatz cyclischer Dipeptide als Katalysatoren für die asymmetrische Addition von Blausäure an aromatische und aliphatische Aldehyde (Abbildung 3-4) [34-38].

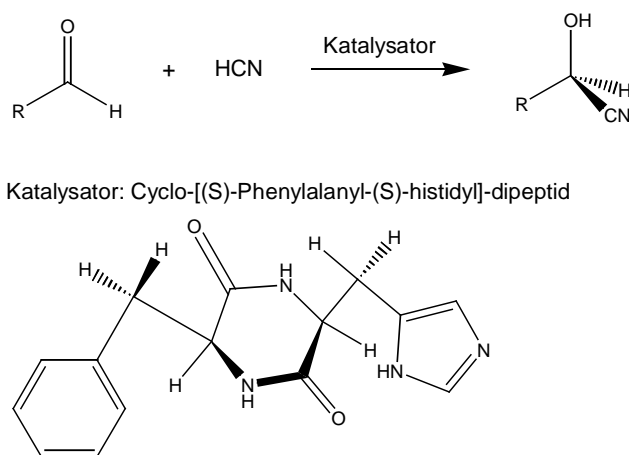


Abbildung 3-4: Asymmetrische Cyanhydrin-Synthese mit cyclischen Dipeptiden

(R = Ph-,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ -,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ -,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ -,  $\text{C}_6\text{H}_{11}$ -

Das Problem bei dieser Methode ist, dass die während der Reaktion gebildeten chiralen Cyanhydrine unter dem Einfluss des basischen Dipeptids racemisieren. Es wird nur bei geringen Umsätzen hohe optische Reinheiten erzielt. Für die Synthese von (R)-Mandelonitril erhielten die Autoren bei 40% Umsatz einen ee-Wert von 90%. Bei 90% Umsatz erreichten sie dagegen nur noch ein ee-Wert von 21%. Die nach diesem Verfahren synthetisierten aliphatischen Cyanhydrine besitzen Enantiomerenüberschüsse zwischen 25% und 69% [37]. Führt man die Reaktion statt in Benzol in Toluol durch und erniedrigt gleichzeitig die Reaktionstemperatur auf  $-20^\circ\text{C}$ , lassen sich

die Enantiomerenüberschüsse bei höheren Umsätzen bedeutend steigern. Für (R)-Mandelsäurenitril wird in diesem Fall ein ee-Wert von 97% bei 97% Umsatz erreicht [39]. Für die weiterverarbeitende Industrie ist die erreichte Enantiomerenreinheit noch nicht ausreichend. Die technische Realisierung der Reaktion ist aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen zu aufwendig.

Sehr gute chemische Ausbeuten und optische Reinheiten von Cyanhydrinen liefert die asymmetrische Synthese über diastereomere Acetal-Templates (Abbildung 3-5) [40].

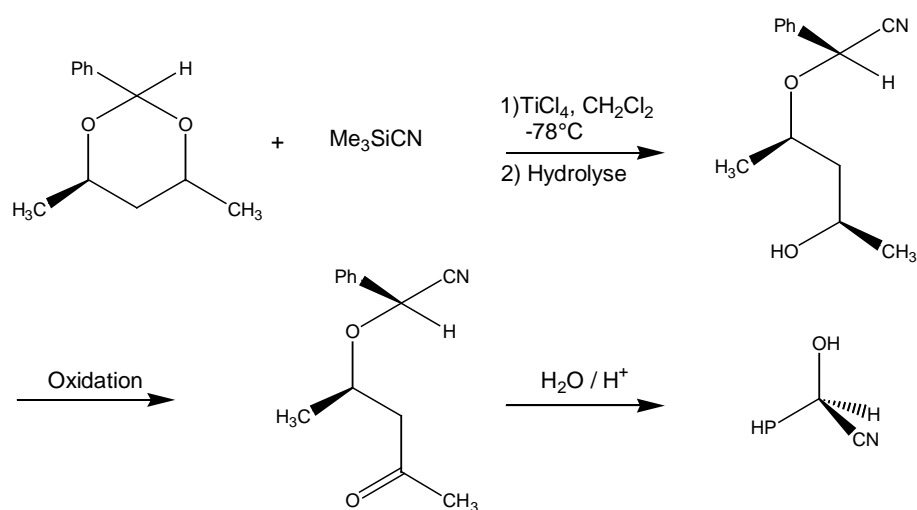


Abbildung 3-5: Asymmetrische Cyanhydrin-Synthese über Acetal-Templates

Auf diesem Weg können sowohl aromatische als auch aliphatische (R)-Cyanhydrine mit einer chemischen Ausbeute von 97% und einem ee-Wert von über 91% hergestellt werden [40].

Die Cyanosilylierung mit chiralen Titanreagenzien als Katalysator liefert ebenfalls sehr gute Enantiomerenüberschüsse, z.B. 96% ee beim Benzaldehydcyanhydrin [41-42, 142] bzw. 82% ee beim 4-Methylbutyraldehydcyanhydrin (Abbildung 3-6) [43].

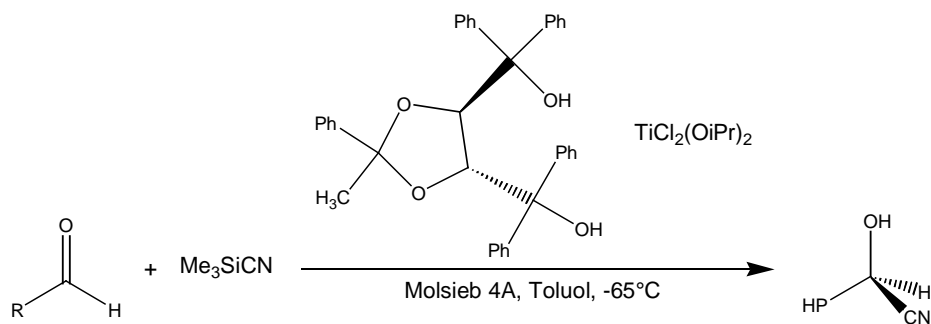


Abbildung 3-6: Cyanosilylierung mit chiralen Titanreagenzien (R = Ph-, PhCH<sub>2</sub>-, PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>-)

Auch optisch aktive Aminoaldehyde [44-45] und  $\alpha$ -Hydroxyaldehyde [46, 9] konnten unter Lewis-Säure-Katalyse mit Trimethylsilylcyanid bzw. Tributylzinncyanid [47] in hoher Diastereomerenausbeute zu optisch aktiven 3-Amino-2-hydroxynitrilen und 2,3-Dihydroxynitrilen umgesetzt werden.

### 3.1.2 Enzymatische Cyanhydrinsynthese

#### 3.1.2.1 Kinetische Racematspaltung mit Lipasen und Esterasen

Eine weitere Methode zur Herstellung von chiralen Cyanhydrinen ist die kinetische Racematspaltung von Cyanhydrin-Estern mit Lipasen und Esterasen [48-49]. Durch asymmetrische Spaltung racemischer Cyanhydrin-Ester sind optisch aktive Cyanhydrine in guten optischen Ausbeuten zugänglich (Abbildung 3-7).



Abbildung 3-7: Kinetische Racematspaltung von Cyanhydrin-Estern mit Lipasen und Esterasen

MATSUO und OHNO beschreiben die kinetische Racematspaltung von 2-Acetoxy-3-aryloxypropionnitrilen mit einer Lipase aus *Pseudomonas* sp. Man erhält (S)-2-Acetoxy-3- $\alpha$ -naphthyloxypropionnitril, eine Vorstufe des  $\beta$ -Blockers (S)-Propanol, mit einer Enantiomerenausbeute von 87% [49].

OHTA gelang mit Zellen des Mikroorganismus *Bacillus coagulans* die asymmetrische Hydrolyse von Estern des 2-Hydroxy-3-aryloxypropionitrils in sehr guten optischen Ausbeuten von 77% bis > 95% (Abbildung 3-8) [50-51].

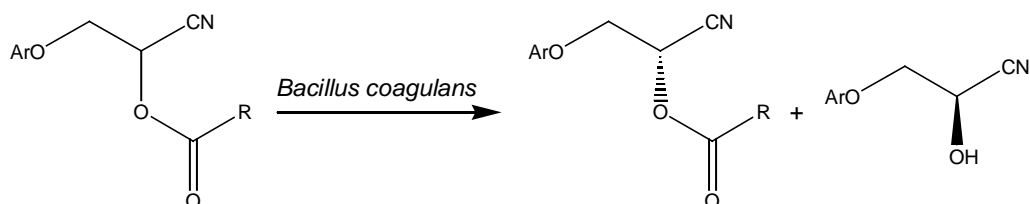


Abbildung 3-8: Asymmetrische Hydrolyse von Estern des 2-Hydroxy-3-aryloxypropionitrils

SCHNEIDER und Mitarbeiter setzten ebenfalls mit einer *Pseudomonas sp.* Lipase eine Reihe aliphatischer und aromatischer Cyanhydrinacetate um. Die Enantiomerenausbeuten lagen zwischen 30% und >98% [52].

Penicillin-Acylase spaltet enantioselektiv die Phenylessigsäureester von 2-Furylcarbinolen mit 72% ee.

WONG et al. setzten racemische freie Cyanhydrine mit Vinylacetat in Methylenchlorid unter Lipase-Katalyse um (Abbildung 3-9) [53].

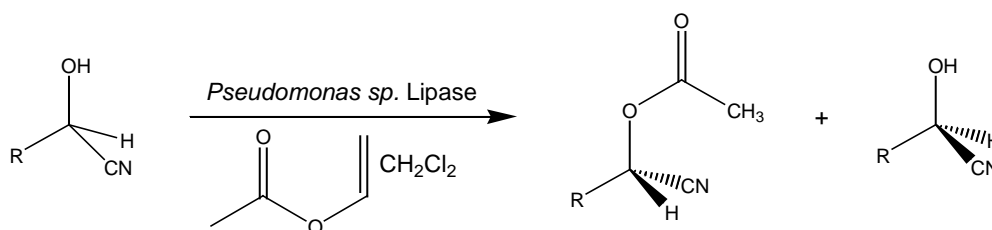


Abbildung 3-9: Umesterung des (R)-Phenylpropionaldehydcyanhydrins

Diese irreversible Umesterung erbrachte im Falle des (R)-Phenylpropionaldehydcyanhydrins einen Enantiomerenüberschuss von 98%.

Die Hydrolyse von racemischen Cyanhydrin-Estern wird mit der Umesterung mit primären Alkoholen und der enantioselektiven Veresterung racemischer Cyanhydrine in Gegenwart verschiedener Lipasen in [54] verglichen. Durch eine dem jeweiligen Syn-

these problem angepasste Vorgehensweise sind sowohl (R)- als auch (S)-Cyanhydrine in guten Enantiomerenausbeuten zugänglich.

Der Nachteil der oben aufgeführten Verfahren zur Herstellung von Cyanhydrinen ist die zu geringe Enantioselektivität. Mit der Entdeckung der Enzymsynthesen und deren Möglichkeiten für die Katalyse wurde versucht, diese durch den Einsatz von Biokatalysatoren zu überwinden.

### 3.1.2.2 (R)-Oxynitrilase katalysierte Synthese von (R)-Cyanhydrinen

Das Enzym (R)-Oxynitrilase [E.C. 4.1.2.10] aus *Prunus amygdalus*, den Bittermandeln, ist eines der am längsten bekannten Enzyme [23]. Das Enzym wurde bereits 1908 von ROSENTHALER als Bestandteil des Enzymkomplexes Emulsin, der zusätzlich noch  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidaseaktivität besitzt, beschrieben. NORDEFELDT sowie ALBERS et al. haben Entscheidendes zur Kenntnis des Ferments beigetragen. Insbesondere verdankt man ALBERS die Ausarbeitung von verlässlichen Testmethoden und Vorschläge zur Reinigung der (R)-Oxynitrilase [19, 21]. Aber erst im Jahre 1963 gelang es PFEIL, die (R)-Oxynitrilase in größeren Mengen zu isolieren und zu charakterisieren [24].

Als Emulsinkomplex ist die (R)-Oxynitrilase in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Sie kommt außer in Bittermandeln noch in Früchten aus der Familie der *Prunoidae*, z.B. Süßmandeln, Pflaumen, Schlehe, Kirsche, Pfirsich, Aprikose und der *Maloidae* z.B. Apfel, japanische Zierquitte und Quitte vor [55, 56].

Allen der oben aufgeführten Pflanzen gemeinsam sind die cyanogenen Glycoside Amygdalin und Prunasin, die (R)-Benzaldehydcyanhydrin als Aglycon gebunden an Gentobiose bzw. Glucose enthalten (Abbildung 3-10).

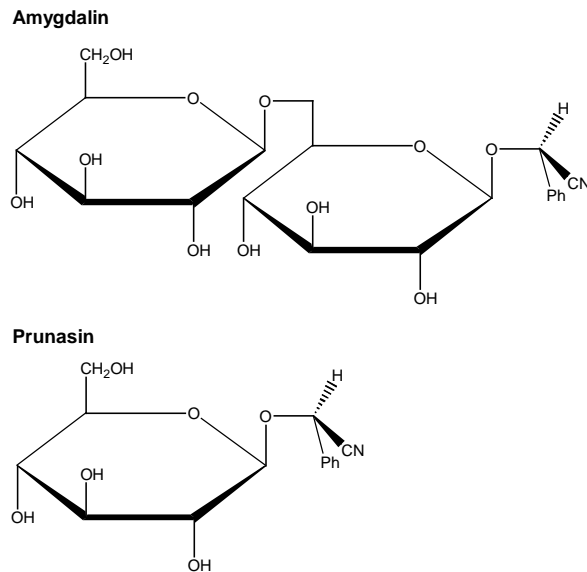


Abbildung 3-10: Strukturformeln von Amygdalin und Prunasin

Die im Emulsinkomplex vorhandene Glycosidase spaltet zunächst Amygdalin bzw. Prunasin in (R)-Benzaldehydcyanhydrin und Glucose. Anschließend katalysiert die (R)-Oxynitrilase die Spaltung des (R)-Benzaldehydcyanhydrins in Benzaldehyd und Blausäure (Abbildung 3-11). Somit ist Benzaldehyd das natürliche Substrat des Enzyms [55, 56].

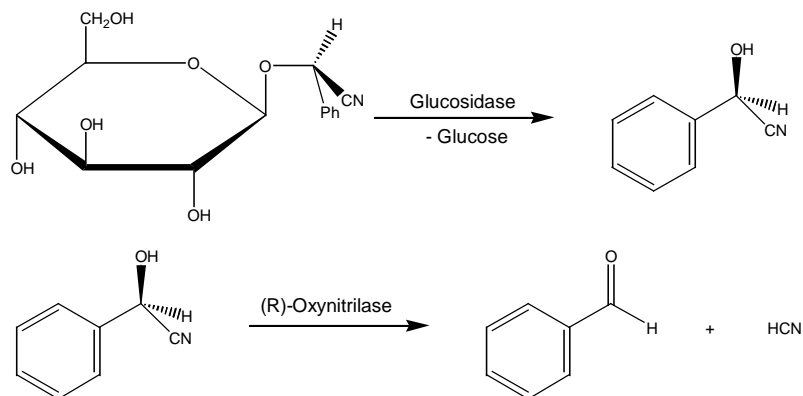


Abbildung 3-11: Enzymatische Spaltung des Prunasins

Die (R)-Oxynitrilase ist ein Flavoprotein mit Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als prosthetischer Gruppe [24, 56]. Über die Struktur und die Funktionsweise des Enzyms ist nur wenig bekannt. Die gelbe Farbe der Enzymlösung lässt sich auf das im Molekül enthaltene Flavin (7,8-Dimethylisalloxazin) zurückführen [24]. Bei der Abspal-

tung des Cofaktors verliert das Enzym seine Aktivität und damit auch seine Färbung [57, 58].

Das Molekulargewicht des Enzyms (R)-Oxynitrilase beträgt 57-59 kDa. Sie ist ein Glycoprotein, das  $\alpha$ -D-Glucosyl- und  $\alpha$ -D-Mannosylreste als Kohlenhydratseitenkette besitzt [59].

Die (R)-Oxynitrilase kann direkt aus Bittermandeln oder vorteilhafter aus entfetteter Mandelkernkleie (*Placenta amygdalarum amararum*), die bei der Mandelölgewinnung als Pressrückstand anfällt, gewonnen werden [60].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym von den Firmen ASA (ASA SPEZIAL ENZYME GMBH; Braunschweig), ROCHE (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, Penzberg) und SIGMA-ALDRICH (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH; Schnellendorf) bezogen.

## 3.1.2.2.1 Synthese in wässrigen Systemen

Chirale Cyanhydrine können durch die mit (R)-Oxynitrilase katalysierte Addition von Blausäure an Aldehyde in hohen chemischen und optischen Ausbeuten gewonnen werden (Abbildung 3-12) [38-39, 61].

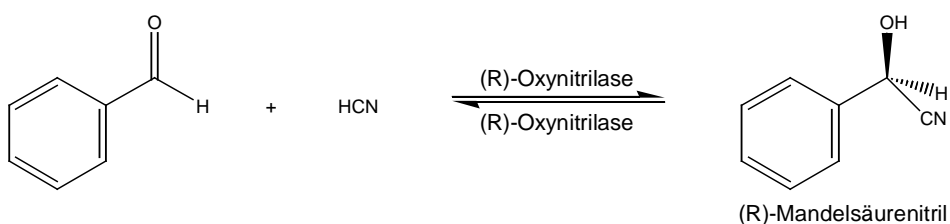


Abbildung 3-12: Enzymatische Cyanhydrinsynthese

Ab Anfang der 60er Jahre untersuchte PFEIL mit seiner Arbeitsgruppe die enzymatische Cyanhydrinsynthese in wässrigem-, bzw. 50% alkoholischem Acetatpuffer (pH-Wert zwischen 4,8 und 5,4) [62]. Mit dem nativen und immobilisierten Enzym wurden neben dem natürlichen Substrat Benzaldehyd eine Vielzahl anderer, sowohl aromatischer als auch heterocyclischer und aliphatischer Aldehyde umgesetzt. Da damals nur der Drehwert des reinen (R)-Mandelsäurenitrils bekannt war, konnten über die



optischen Ausbeuten der anderen Cyanhydrine keine Aussage gemacht werden. Für (R)-Mandelsäurenitril wurde ein ee-Wert von 92% gemessen.

Mit dem von BECKER und PFEIL etablierten wässrigen Reaktionsmilieu erhielten andere Autoren mit nichtnatürlichen Substraten des Enzyms, die längere Reaktionszeiten erfordern, unbefriedigende Enantiomerenüberschüsse. Die geringe optische Reinheit dieser Cyanhydrine ist darauf zurückzuführen, dass unter diesen Reaktionsbedingungen parallel eine nichtenzymatische Reaktion abläuft, die zu Racematen und somit zu geringen Enantiomerenüberschüssen führt.

Die Unterdrückung der unkatalysierten Reaktion kann u. a. durch die Durchführung der Reaktion in sauren wässrigen Systemen erreicht werden [63-64]. pH-Werte unter drei führen jedoch zu einer starken Deaktivierung des Enzyms. Es können auf diesem Weg bei gut wasserlöslichen Substraten hohe Enantiomerausbeuten erzielt werden. Wasserunlösliche Substrate lassen sich jedoch so nicht erfolgreich umsetzen, da aufgrund der geringen Löslichkeit von hydrophoben Substraten in wässrigen Reaktionsmedien eine biokatalytische Reaktion oft wegen der damit einhergehenden geringen Reaktionsgeschwindigkeit limitiert ist. Dieses Problem lösten EFFENBERGER et al. [65] dadurch, dass sie die enzymatische Reaktion in einem Zwei-Phasen-System (organisches/wässriges System) durchführten.

#### **3.1.2.2.2 Synthese in organischen Lösungsmitteln**

Bei der Durchführung der durch (R)-Oxynitrilase katalysierter Addition von Blausäure an Aldehyde in organischen Lösungsmitteln wurden sehr hohe chemische Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse erreicht. Diese Vorgehensweise bietet entscheidende Vorteile im Vergleich zur Synthese in wässrigen Systemen. Durch Zurückdrängen der unkatalysierten Addition von Blausäure an Aldehyde sind höhere Enantiomerenüberschüsse möglich. Sowohl die Substrate als auch das Produkt sind gut in organischen Lösungsmitteln löslich, d. h. auch schwer wasserlösliche Substrate können erfolgreich umgesetzt werden. Als Lösungsmittel für die enzymkatalysierte Cyanhydrinsynthese eignen sich Essigsäureethylester [26] sowie Diisopropylether [66]. Zwar führt die enzymatische Reaktion in Gegenwart organischer Lösungsmittel zu optisch hochreinen Cyanhydrinen, doch ist diese Variante nach heutigem Wissensstand für

die Industrie ökonomisch uninteressant. Die Enzymkosten sind in diesem Fall im Unterschied zur Stärkeverzuckerung ein entscheidender Faktor bei den Produktionskosten. Auf die Stärkeverzuckerung wird auf Seite 32 näher eingegangen. Aus diesem Grund muss eine Wiederverwendung der Enzyme in Betracht gezogen werden. Auch bei der Stärkeverzuckerung werden die eingesetzten Enzyme im Prozess deaktiviert, da sie aber sehr preisgünstig sind, ist eine Wiederverwertbarkeit in diesem Fall nicht nötig.

Für den Wiedereinsatz muss erst die Stabilität der Biokatalysatoren untersucht werden. Auch muss eine preisgünstige Methode für die Enzymrückgewinnung gefunden werden.

Eine Wiedergewinnung der Enzyme mit den bei der Herstellung verwendeten Methoden (Chromatographie, Ultrafiltration) ist im Allgemeinen zu teuer. Kostengünstiger sind Methoden, die eine Vergrößerung des Molekulargewichts des Enzyms bewirken. Die so vergrößerten Biokatalysatoren können von Prozessbeginn an zurückgehalten werden und müssen nicht nachträglich wiedergewonnen werden. Die Einsparungen an zusätzlichen Prozessschritten führen zu einer höheren Rentabilität des Prozesses und können zur Marktfähigkeit des enzymatisch katalysierten Produktes führen.

### **3.2 Immobilisierung von Biokatalysatoren**

Die Immobilisierung von Enzymen ist ein biotechnologisches Verfahren, das zunehmend an Bedeutung gewinnt [27]. Hierbei werden die normalerweise wasserlöslichen Enzyme mit einer wasserunlöslichen Substanz verknüpft, sodass sie ihre freie Beweglichkeit verlieren. Dies führt zu einer Verlagerung der katalytischen Aktivität von submikroskopisch und mikroskopisch kleinen Einheiten in makroskopisch fassbare Partikeln. Solche immobilisierten Enzyme lassen sich mitsamt ihrer Trägersubstanz durch einfache Methoden wieder von der Reaktionslösung trennen und daher mehrfach verwenden, was bei sehr teuren Enzymen hilft, die Kosten zu senken.

Lange bevor die Immobilisierungstechniken als solche bekannt waren, wurden bereits immobilisierte Biokatalysatoren in der Praxis eingesetzt. Um 1815 konnte man effektiv Essig herstellen, indem man alkoholhaltige Lösungen über Holzspäne rieseln ließ.

Dies geschah rein empirisch. Man wusste nicht, dass hierdurch ein Anhaften von Essigsäurebakterien auf den Holzspänen eingeleitet wird. Bis in die 60er Jahre unseres Jahrhunderts fanden die spärlichen Publikationen zur Enzymimmobilisierung wenig Beachtung. Das dann einsetzende industrielle Interesse änderte jedoch die Situation tief greifend, was sich nicht zuletzt in einem sprunghaften Anstieg entsprechender Publikationen zeigte. Zur ersten industriellen Anwendung kam es 1969, als eine japanische Firma immobilisierte L-Amino-Acylase zur Trennung eines Gemisches aus L- und D-Aminosäuren nutzte.

### 3.2.1 Immobilisierungsmethoden

Zwei grundsätzliche Methoden sind bei der Immobilisierung zu unterscheiden: die Immobilisierung durch Kopplung und die Immobilisierung durch Einschluss. Beide Gruppen können wiederum in Untergruppen unterteilt werden (Abbildung 3-13).

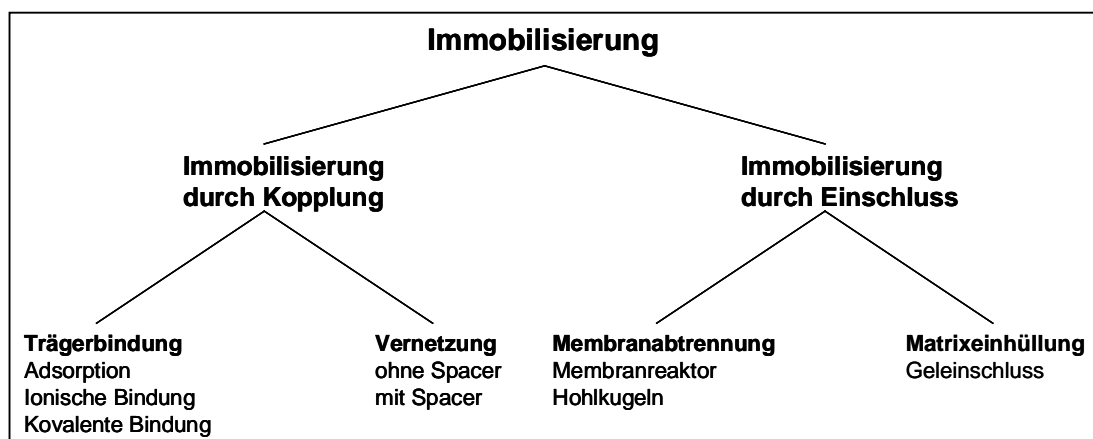


Abbildung 3-13: Immobilisierungsmethoden [27]

In Abbildung 3-14 sind die einzelnen Methoden schematisch dargestellt, um sich ein besseres Bild von der Struktur machen zu können.

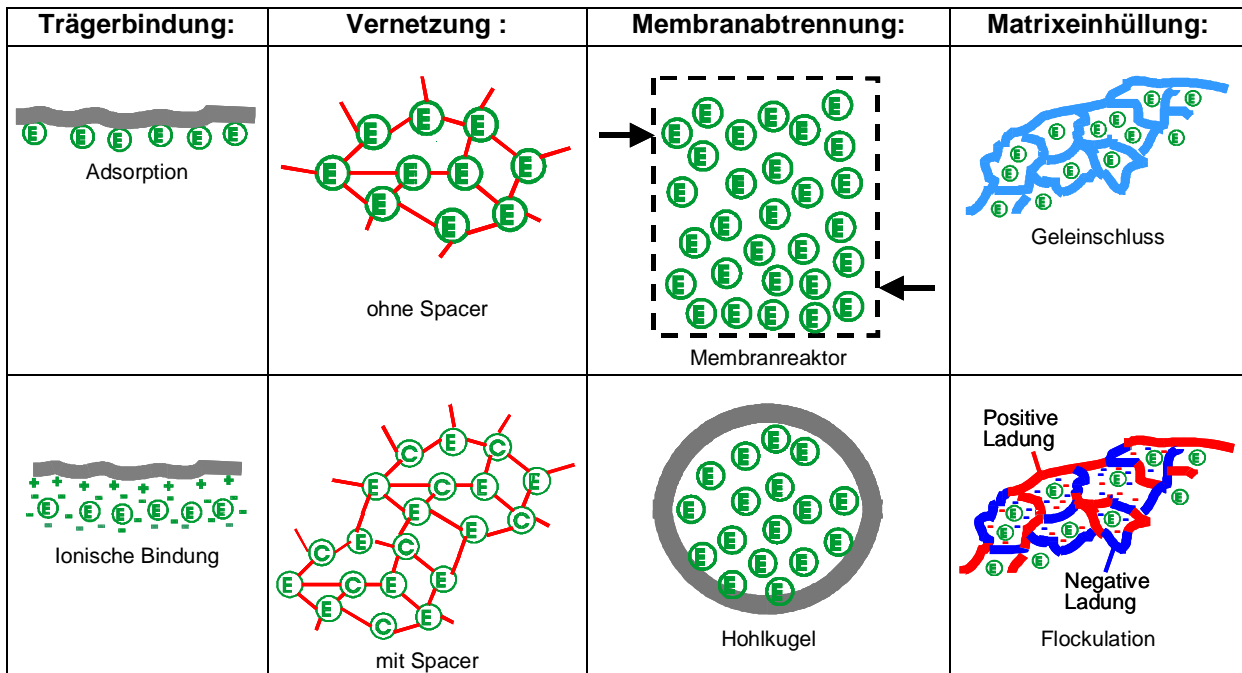


Abbildung 3-14: Schematische Darstellung der Immobilisierungsmethoden (E = Enzym, C = Spacer)  
[27, 71-74]

### 3.2.1.1 Immobilisierung durch Kopplung

#### 3.2.1.1.1 Trägerbindung

Die einfachste Form der Immobilisierung ist die Bindung eines Biokatalysators an einen Träger. Die Bindung an einen Träger erfolgt durch Adsorption, Ionenbindung oder kovalente Bindung (Abbildung 3-14).

**Adsorptive Bindung:** Hierbei wird das Enzym durch physikalische Kräfte (van-der-Waals-Kräfte) an wasserunlösliche Trägerstoffe (z.B. Tone, Silicagele, modifizierte Dextrane) gebunden. Vorteile dieser Methode sind die einfache Durchführbarkeit dieser Immobilisierungstechnik und die Beibehaltung der Proteinkonformation durch die geringen Wechselwirkungskräfte. Ein Nachteil sind die relativ schwachen Bindungskräfte. Die adsorbierten Biokatalysatoren können sowohl durch Temperatur- und pH-Wertschwankungen als auch durch Änderungen in der Substrat- und Ionenkonzentration leicht wieder desorbiert werden [27].

**Ionische Bindung:** Die Bindung an feste Träger erfolgt hier über ionische Kräfte zwischen der Oberfläche des Trägermaterials und der geladenen Gruppen der Proteine. Basische und saure Ionenaustauscherharze sind geeignete Träger. Die Vor- und Nachteile entsprechen denen der adsorptiven Bindung. Die Beeinflussung der Bindung durch äußere Faktoren ist erheblich. So können Änderungen im pH-Wert zur Abtrennung der Proteine führen, da die Ladung der funktionellen Gruppen geändert wird [27].

**Kovalente Anbindung:** Hierbei kommt es zwischen dem Träger und dem Enzym zur Ausbildung gemeinsamer Elektronenpaare. Aus diesem Grund gilt diese Methode als stabilste Immobilisierungstechnik. Meist wird ein aktivierter Träger eingesetzt, der mit den in Aminosäuren vorkommenden Sulfhydryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Imidazol- oder Phenolgruppen des Biokatalysators reagiert. Nachteil ist die starke Belastung der Biokatalysatoren durch die extreme Immobilisierungsprozedur, welche zu starken Konformationsänderungen und damit zu Aktivitätsverlusten führen kann [70].

#### **3.2.1.1.2 Quervernetzung**

Durch Quervernetzung werden ebenfalls vergrößerte Partikel mit hoher katalytischer Aktivität hergestellt. Hierbei werden die einzelnen Biokatalysatoreinheiten durch bi- oder polyfunktionelle Reagenzien miteinander verbunden. Entweder wird der Biokatalysator direkt mit sich selbst quervernetzt oder aber über einen geeigneten Spacer (Abbildung 3-14). Das zum Quervernetzen mit Abstand am häufigsten verwendete bifunktionelle Reagenz ist Glutardialdehyd [27, 75].

#### **3.2.1.2 Immobilisierung durch Einschluss**

##### **3.2.1.2.1 Membranabtrennung**

Bei der Membranabtrennung wird der Biokatalysator durch semipermeable Membranen zurückgehalten. Zu diesen Immobilisierungsmethoden gehören unterschiedliche Verfahren wie Membranreaktoren und Hohlkugeln (Abbildung 3-14).

### **3.2.1.2.2 Matriceinhüllung**

Bei diesem Verfahren werden die Biokatalysatoren in eine Matrix eingebettet, die einen Zutritt von Substraten und das Austreten der gebildeten Produkte zulässt [76]. Der Geleinschluss ist Gegenstand dieser Arbeit und soll aus diesem Grund näher betrachtet werden.

Der Einschluss von Biokatalysatoren in Gelen ist ein weit verbreitetes Verfahren in der Biotechnologie, der Medizin und der Lebensmitteltechnologie. Für den Einschluss von Biokatalysatoren ist eine Vielzahl von Materialien untersucht worden. Neben synthetischen Polymeren wie etwa Polyurethanen oder Polyvinylalkohol (PVA) sind vor allem natürliche Polymere weit verbreitet. Hier sind in erster Linie Alginat, Agar, Pektin, Carrageenan und Chitosan zu nennen [77-82].

Vielfach werden natürliche Polymere bevorzugt, da man eine gute Verträglichkeit mit dem Biokatalysator erwartet. Dem gegenüber stehen verschiedene Nachteile, so etwa die oft geringe mechanische Stabilität der Immobilisate [83] sowie die biologische Abbaubarkeit, die meist zu einer sterilen Prozessführung zwingt [84-85, 138].

Im Vergleich dazu sind Gele auf Basis von PVA oder Polyurethanen, z.B. Polycarbamoylsulfonat (PCS), mechanisch deutlich stabiler. Eine gute mechanische Stabilität des immobilisierten Biokatalysators ist die Voraussetzung für lange Standzeiten im Reaktor [86-88].

## **3.2.2 Polyvinylalkohol als Immobilisierungsmatrix**

### **3.2.2.1 Polyvinylalkohol**

Polyvinylalkohol ist heute ein technisches Massenprodukt, das vielfältige Anwendung z.B. in der Textil-, Papier-, Folien-, Klebstoff-, Keramik-, Lack-, Farben- und Verpackungsindustrie findet. Die jährliche Produktion beträgt weltweit über 400.000 Tonnen [89].

PVA ist aus 1,3-Glykoleinheiten aufgebaut. Seine Eigenschaften, beispielsweise die Viskosität, werden hauptsächlich durch seinen Polymerisations- und Hydrolysegrad bestimmt. PVA wird durch Hydrolyse von Polyvinylacetat hergestellt [94, 116-117]. Bei der Herstellung wird zunächst in Methanol Vinylacetat zu Polyvinylacetat (PVAc) polymerisiert. Nachfolgend wird aus PVAc durch Abspalten der Acetatgruppen Polyvinylalkohol hergestellt [126-127]. Dies erfolgt entweder durch alkalische Alkoholyse mit Methanol oder durch rein alkalische Hydrolyse in Wasser. Polyvinylalkohol wird sowohl teil- als auch vollverseift (Abbildung 3-15).

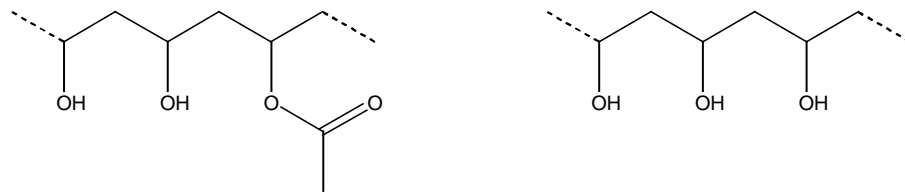


Abbildung 3-15: Ausschnitt eines teil- (links) und eines vollverseiften (rechts) Polyvinylalkohols [126, 93]

Bei einem Hydrolysegrad von 88 % zeigt PVA die beste Löslichkeit [90-94]. Da die anwendungstechnischen Eigenschaften des PVA in erster Linie von dem Molekulargewicht und dem verbliebenen Anteil an Acetylgruppen abhängen, sind die technischen Herstellungsverfahren auf eine genaue Einhaltung dieser Kenndaten ausgerichtet [94].

### 3.2.2.2 Hydrogele aus Polyvinylalkohol

Als Hydrogele werden Wasser enthaltende Gele auf der Basis hydrophiler, aber wasserunlöslicher Polymere bezeichnet, die als dreidimensionales Netzwerk vorliegen. In Wasser quellen diese Polymere bis zu einem Gleichgewicht-Volumen unter Formhaltung auf.

Die Netzwerk-Bildung erfolgt vorwiegend über kovalente Verknüpfungen der Polymere, ist aber auch über elektrostatische, hydrophobe oder Dipol/Dipol-Wechselwirkungen zwischen einzelnen Segmenten der Polymerketten möglich. Die notwendige Hydrophilie der Polymere vermitteln u.a. Hydroxyl-, Carboxylat-, Sulfonat- oder Amid-Gruppen.

Über die Wahl der zum Polymeraufbau verwendeten Monomere, die Art der Vernetzung und die Vernetzungsdichte können gewünschte Eigenschaften der Hydrogele gezielt eingestellt werden. Hydrogele sind im Allgemeinen gut verträglich mit lebenden Geweben. Die Fähigkeit, Wasser ohne Form- und Festigkeitsverlust aufzunehmen, ist für natürliche, z.B. in Muskeln vorkommende, Hydrogele von Bedeutung.

Die Nahordnung der PVA-Ketten im festen Zustand wird beim Lösen in warmem Wasser durch Solvation der Hydroxylgruppen mit Wassermolekülen aufgebrochen, wodurch eine viskose Lösung entsteht. Lässt man eine konzentrierte PVA-Lösung stehen, so lässt sich nach einiger Zeit ein Viskositätsanstieg beobachten, der bis zu einer Gelierung führen kann [94]. Die Hydrogelierung beruht darauf, dass sich in einigen Bereichen die Polymerketten durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen wieder aneinanderlagern, allerdings nicht in dem Ausmaß des festen Zustands (Abbildung 3-16) [76].

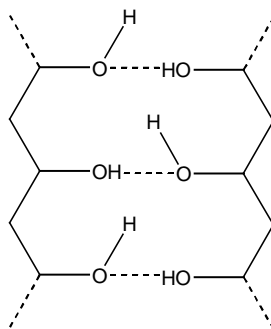


Abbildung 3-16: Gelbildung durch Wasserstoffbrückenbindung [94]

Es sind verschiedene Methoden zur Bildung von PVA-Hydrogelen beschrieben worden. Eine der wichtigsten Methoden ist die Gelierung durch Temperaturverringerung (Einfrieren) gefolgt von einem langsamen Auftauvorgang. Durch diese Kryogelierung, allgemein als Freeze-Thaw-Methode bekannt, können stabile Hydrogele erzeugt werden [82, 88]. Bei dem Mechanismus der Gelierung wird davon ausgegangen, dass durch das Ausfrieren des Wassers die Konzentration des PVAs in den nicht gefrorenen Bereich so sehr erhöht wird, dass dadurch die Polymerketten über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander in Wechselwirkung treffen [118-119]. Eine schematische Darstellung der Kryogelierung von PVA zeigt die Abbildung 3-17.



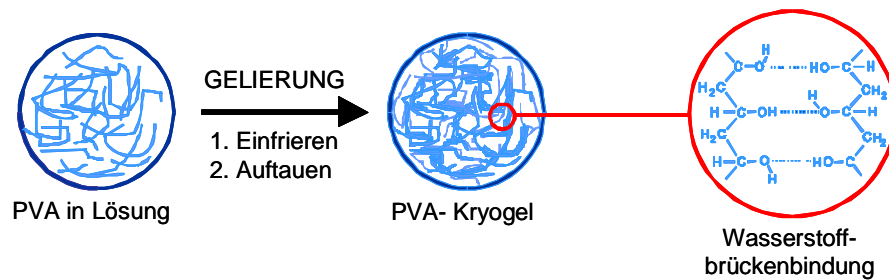


Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Kryogelierung von PVA [127]

Die Stabilität der Freeze-Thaw-Gele lässt sich durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen deutlich erhöhen [120]. Besonders wichtig ist dabei ein langsames Auftauen [118, 121]. Durch den Zusatz von Alkohol oder Polyolen, z.B. Ethanol, Ethylenglycol, Glycerin oder Polyethylenglycol (PEG), zu den wässrigen PVA-Lösungen entstehen auch bei nur einmaligem Einfrieren bereits Gele mit hoher Stabilität und sehr guten mechanischen Eigenschaften [121-123]. Die Gelierung wird insbesondere bei der Verwendung von PEG als Zusatzstoff durch das Phänomen der spinodalen Dekomposition forciert (Abbildung 3-18).

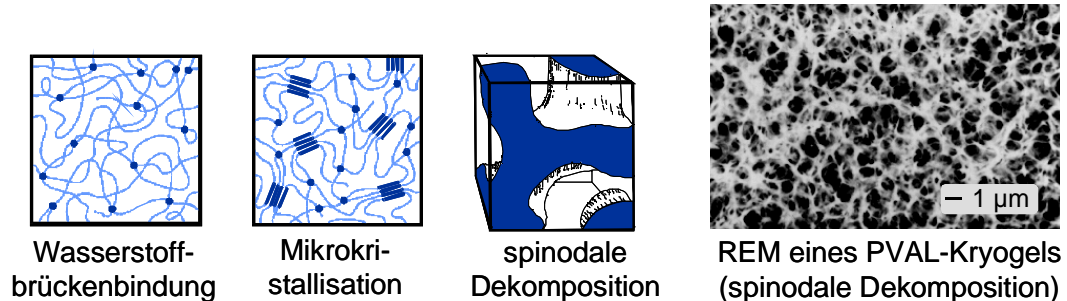


Abbildung 3-18: Gelierungsarten und REM-Aufnahmen [127]

Dabei wird durch die Abkühlung der wässrigen PVA-PEG-Lösung eine flüssig-flüssig-Phasentrennung initiiert, die zur Ausbildung einer PVA-reichen und einer PVA-armen Mikrophase führt [76]. In der PVA-reichen Mikrophase ist dann die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgrund der räumlichen Nähe ermöglicht [123].

Von besonderer Wichtigkeit für die Stabilität der Gele ist darüber hinaus der Verseifungsgrad des PVAs. Hierfür ist ein Deacetylierungsgrad von mindestens 83 % erforder-

derlich, da sich anderenfalls amorphe Bereiche ausbilden können, die ein Zustandekommen von linearen Strukturen mit Wasserstoffbrückenbindungen verhindern.

Hinreichend stabile Gele lassen sich nur mit vollverseiftem PVA (Verseifungsgrad > 98 %) herstellen, da ansonsten die Restacetatgruppen die notwendige Annäherung der Polymerketten zur Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen sterisch behindern [118-119].

Sowohl die notwendige niedrige Temperatur von - 20°C als auch die lange Dauer des Immobilisierungsvorganges kann zu einer Schädigung besonders bei empfindlichen Biokatalysatoren führen.

Um dennoch die positiven Eigenschaften von Polyvinylalkohol für die Einschlussimmobilisierung von Biokatalysatoren nutzen zu können, wurde ein Verfahren zur schnellen Herstellung stabiler PVA-Gele bei Raumtemperatur entwickelt [95]. Dabei wird die Gelierung durch den Zusatz von Polyethylenglycol und anschließender Trocknung bis zu einer definierten Restfeuchte erreicht. Es können verschiedene Formen der Hydrogele, unter anderem auch Linsen (LentiKats®), hergestellt werden.

### 3.2.2.3 Linsenförmige PVA Hydrogelpartikel-LentiKats®

Neben der Nutzung von PVA als kostengünstige sowie mechanisch stabile Gelkomponente weisen LentiKats® (Abbildung 3-19) eine Reihe weiterer Vorteile auf.

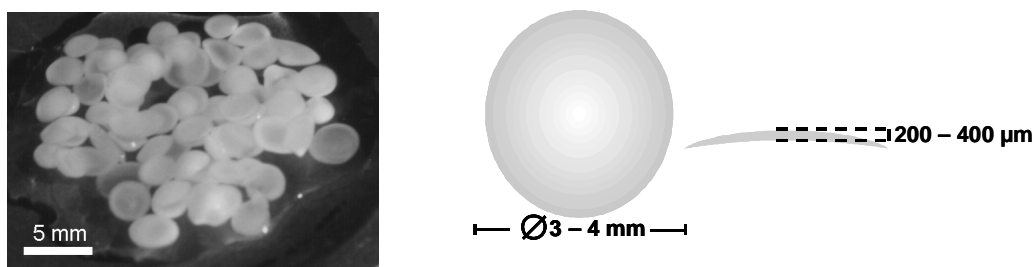


Abbildung 3-19: Foto und Skizze von LentiKats®

Aufgrund des relativ großen Durchmessers von 3 bis 4 mm sind die Partikel problemlos von der Reaktionslösung abzutrennen. Die Rückhaltung in kontinuierlich betrieb-

nen Systemen ist damit einfach zu erreichen. Durch die geringe Dicke der Gelscheiben von nur 200 bis 400  $\mu\text{m}$  und den geringen Anteil an Polymerstegen sind die Diffusionseigenschaften sehr günstig.

Wegen der einfachen Herstellung, insbesondere durch den geringen Zeitbedarf und die milden Herstellungsbedingungen, sind LentiKats<sup>®</sup> sehr gut für die Immobilisierung empfindlicher Biokatalysatoren geeignet [95].

### **3.2.3 Immobilisierungsmethoden für (R)-Oxynitrilase**

Die Herstellung von chiralen Cyanhydrinen unter Verwendung einer an ein Ionenaustauscherharz gebundenen (R)-Oxynitrilase wird in dem Patent DE PS 13 00 111 beschrieben [97]. Da bei dieser Methode der Wert für die Enantioselektivität unter 90% liegt, kommt dieses Verfahren für einen technischen Einsatz nicht in Frage.

Eine Verbesserung der Enantioselektivität kann dadurch erzielt werden, dass die Cyanhydrinsynthese in Gegenwart einer an einen Träger immobilisierten (R)-Oxynitrilase in Essigsäureethylester bei einem pH-Werte von 5,4 durchgeführt wird [98]. Allerdings ist die Enzymstabilität, wie generell in organischen Medien, stark vermindert [99].

Gill et al. erzielten bei der Immobilisierung von (R)-Oxynitrilase ebenfalls eine geringe Langzeitstabilität [100]. Demnach liegt der Aktivitätsverlust nach 322 h bei 87%.

Aus dem US-Patent 4. 859. 784 ist bekannt, dass die Immobilisierung durch Bindung der (R)-Oxynitrilase an Glasoberflächen, Ionenaustauscherharzen oder an Cellulose-Partikel erfolgen kann [101]. Allerdings wird im US-Patent 5.177.242 dargelegt, dass bei Verwendung so immobilisierter (R)-Oxynitrilase eine lange Verweilzeit der Reaktanden (5 bis 6 Tagen) benötigt wird [102].

Eine weitere Immobilisierungsmethode für (R)-Oxynitrilase ist die Einbindung des Enzyms in Flüssigkristalle, die dann in einem Mehrphasen-Prozess zur Synthese chiraler Cyanhydrine eingesetzt werden [103]. Diese Methode wird bevorzugt in kontinuierlichen Reaktoren eingesetzt.

Bei der Sol-Gel-Immobilisierung (Gelatine- oder Si-basierende Methode) werden die Trägerimmobilisate in leicht brüchiger Pulverform und somit in nicht definierter makroskopischer Größe hergestellt. Bei den Gelatine-Gel-immobilisierten Enzymen, deren Partikelgröße sich zwischen 0,3 und 0,5 mm bewegt, was zu Filtrationsproblemen führt, kann zudem nicht in wässrigen Systemen gearbeitet werden [104-105]. Nachteil der Si-basierten Immobilisate ist die nicht definierte makroskopische Größe, die hohe Porosität, die geringe Elastizität, der hohe Aktivitätsverlust und die ökonomisch aufwändige Herstellung [100].

Darüber hinaus sind noch eine Reihe weiterer Methoden zur Immobilisierung von (R)-Oxynitrilase entwickelt worden. Dennoch kamen diese Methoden bisher für den technischen Einsatz nicht in Frage, weil die bisherigen Immobilisierungsmethoden folgende Nachteile aufweisen:

- geringe Langzeitstabilität,
- geringe Abriebsfestigkeit und eingeschränkte mechanische Stabilität,
- Katalysatorleaching,
- geringe Partikelgröße (Filtrationsprobleme) und
- aufwändige und teure Herstellungstechnik.

Im Gegensatz zu diesem Enzym ist aufgrund der hohen Kosten von Biokatalysatoren die Immobilisierung von einigen Biokatalysatoren sehr gut untersucht. Industriell haben sich die Immobilisierung von Glucoseisomerase, Penicillinamidase und L- Aminosäure-Dehydrogenasen auf Trägern aber auch die Immobilisierung von Enzymen zur Online-Analytik in Biosensoren mittlerweile etabliert [112, 144-145]. Da neben existieren viele Immobilisierungsarten von Hefe, die für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt werden [27, 110].

### **3.2.4 Industrielle Verfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren**

Die ersten technischen Verfahren mit immobilisierten Zellen wurden empirisch optimiert und werden noch heute eingesetzt, wie z.B. die Abwasserreinigung im Tropfkörper. Durch Immobilisierung von anaeroben Kulturen auf z.B. Sinterglasschwämmen

men und dem damit verbundenen Aufkonzentrieren der Biomasse lässt sich in neuen Verfahren auch die anaerobe Abwasserreinigung erheblich beschleunigen. Ebenfalls ein altes Verfahren ist die Essig-Fabrikation mit dem Fesselverfahren. Von den neuen Prozessen mit gezielter Immobilisierung haben sich bisher nur relativ wenige in großtechnischem Maßstab bewährt [96].

Im Nahrungsmittelbereich ist der Einsatz von Zellen, die das Enzym Glucose-Isomerase besitzen, das wichtigste Verfahren zur Produktion von fructosehaltigem Sirup. Die Halbwertszeit für die immobilisierte Isomerase beträgt im technischen Einsatz 70 – 120 Tage. Im Jahre 2001 wurden weltweit mit dieser Methode ca.  $11 \times 10^6$  t Isosirup produziert. Zur Glucose-Herstellung aus Stärke wird ebenfalls Glucoamylase versuchsweise immobilisiert eingesetzt. Die Spaltung von Lactose mit Hilfe der immobilisierten  $\beta$ -Galactosidase aus Hefen zu Glucose und Galactose ist in einigen Ländern verwirklicht [96].

Im Lebensmittelbereich ist ein Verfahren etabliert, bei dem mit Hilfe von in Calciumalginatkugeln immobilisierten Zellen des Bakteriums *Protaminobacter rubrum* eine enzymatische Umlagerung (Transglucosidierung) von Saccharose zu Isomaltulose (Palatinose) erfolgt, die in einem zweiten Schritt zu Isomalt (Palatinit) hydriert wird. Die Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt stellte im Jahre 2000 35.000 Tonnen des Zuckeraustauschstoffes Isomalt im Jahr her [124].

Weitere technische Verfahren mit immobilisierten Systemen gibt es bei der Aminosäure-Herstellung und bei der Spaltung von Penicillin G zu 6-Aminopenicillansäure [125].

### 3.3 Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen

Enzyme wirken auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung einer chemischen Reaktion ein. Nur bei wenigen Enzymen konnte der exakte Reaktionsmechanismus annähernd aufgeklärt werden. Es gibt jedoch verschiedene Modelle, die die Enzymkinetik durch Vereinfachungen gut beschreiben. Für die häufigsten Umsetzungen durch Enzyme hat sich die MICHAELIS-MENTEN-Kinetik etabliert [128, 135].

#### 3.3.1 Ein-Substrat-Kinetik

Im einfachsten Fall, in dem nur ein Substrat umgesetzt wird, lässt sich die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration mit Hilfe der von MICHAELIS und MENTEN angegebenen Gleichung beschreiben [67].

#### Einfluss der Inhibitoren auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Die Beeinträchtigung der Enzym-Katalyse durch Inhibitoren ist für verschiedene Bereiche der Biowissenschaften von sehr großem Interesse, da die Effekte vieler Wirkstoffe auf einer Hemmung oder Inaktivierung von Enzymen beruhen. Die Beeinträchtigung der katalytischen Funktion von Enzymen kann in folgende drei Hauptgruppen unterteilt werden:

- **Denaturierung:** Irreversibler Verlust der räumlichen Struktur und der biologisch aktiven Konformation. Denaturierung wird meistens durch Erhitzen oder den Einsatz starker Säuren oder Laugen erreicht [68].
- **Irreversible Hemmung:** Ein Inhibitor verbindet sich irreversibel mit dem Enzym, zumeist mit einem Teil des katalytischen Zentrums, und blockiert dessen katalytische Aktivität [68].
- **Reversible Hemmung:** Enzym-Hemmung, die durch Entfernen des Inhibitors, z.B. durch Dialyse, wieder beseitigt werden kann [68].

Im Folgenden werden reversible Hemmtypen beschrieben.

- **Kompetitive Hemmung:** Ein Inhibitor lagert sich an das aktive Zentrum an.
- **Nichtkompetitive Hemmung:** Ein Inhibitor lagert sich an das Enzym bzw.

an den Enzymsubstratkomplex außerhalb des aktiven Zentrums an.

- **Unkompetitive Hemmung:** Inhibitor lagert sich an den Enzymsubstratkomplex an.
- **Partiel-Kompetitive Hemmung:** Inhibitor lagert sich ebenfalls an das freie Enzym und an den Enzym-Substrat-Komplex. Im Unterschied zur nichtkompetitiven Hemmung beeinflusst aber der Hemmstoff die Katalyse nicht [68].

### 3.3.2 Zwei-Substrat-Kinetik

Die Reaktionsschemata der Mehrsubstrat-Reaktionen sind vielfältiger als bei den Ein-Substrat-Reaktionen. Die Interpretation von Inhibierungseffekten bei Mehrsubstrat-Reaktionen ist durch die Vielzahl an Faktoren deutlich schwieriger, oft sogar unmöglich [69]. Die folgende Diskussion bleibt auf die Zwei-Substrat-Reaktionen beschränkt, da in dieser Arbeit eine solche Reaktion betrachtet wird [70].

Bei der Michaelis-Menten-Kinetik wird die Beteiligung nur eines Substrates am Umsatz angenommen. Tatsächlich sind die meisten durch natürlich vorkommende Enzyme katalysierten Reaktionen aber Zwei-Substrat-Reaktionen. Eine Möglichkeit, Zwei-Substrat-Reaktionen zu betrachten, ist die Vereinfachung des Systems auf eine Pseudo-Ein-Substrat-Kinetik, da bei der Ermittlung der kinetischen Daten ein Substrat in Sättigungsmenge vorgegeben wird. Als Ergebnis können nur die kinetischen Konstanten bezüglich des jeweils variierten Substrats bestimmt werden. Zu erwähnen ist hier, dass der Michaelis-Menten-Ansatz für zwei Substrate keinerlei Auskunft über den Mechanismus einer enzymkatalysierten Reaktion gibt. Es ist ein formalkinetischer Ansatz, um die Reaktion zu beschreiben. Der wesentliche Vorteil der Michaelis-Menten-Kinetik ist die anschauliche Bedeutung der kinetischen Parameter, die auch zur Beschreibung realer Reaktoren ausreichend sind. Mechanistische Modelle beschreiben die Enzymkinetik durch den Reaktionsmechanismus mit allen Teilschritten in der korrekten, zeitlichen Reihenfolge. Bei Enzymen, die zwei Substrate benötigen, kommen mehrere Modelle in Frage, die sich durch die Bindungs- und Ablösereihenfolge der beteiligten Substrate und Produkte im aktiven Zentrum unterscheiden [109]. Die kinetischen Mechanismen der Zwei-Substrat-Reaktionen lassen sich in zwei großen Gruppen unterteilen, wobei die Nomenklatur von CLELAND verwendet wird.

**Ping-Pong-Mechanismus:** Als Ping-Pong-Mechanismus wird die Reaktionsfolge bezeichnet, bei der zunächst das eine Substrat bindet und in sein Produkt umgewandelt wird. Danach lagert sich das zweite Substrat an und reagiert. Das Enzym wechselt dabei zwischen zwei oder mehreren stabilen Formen hin und her.

**Sequenzieller Mechanismus:** Der sequenzielle Mechanismus lässt sich weiter danach differenzieren, in welcher Reihenfolge die Anlagerung der Substratmoleküle erfolgt:

- in stets gleicher Reihenfolge (geordnet, obligatorisch, engl. order)
- Ordered-Bi-Bi-Mechanismus
- in zufälliger Reihenfolge (Zufall, engl. random)
- Random-Bi-Bi-Mechanismus [70]

Ein Ordered-Mechanismus liegt vor, wenn zunächst das eine Substrat binden muss, damit sich das zweite Substrat anlagern kann. Dieser Reaktionsmechanismus ist häufig bei Dehydrogenasen anzutreffen, bei denen das Coenzym vor dem anderen Substrat bindet.

Beim Random-Mechanismus binden zunächst beide Substrate in beliebiger Reihenfolge an das Enzym, danach verlässt das Produkt den Enzym-Substrat-Komplex. Durch die nachgestellten Silben Uni, Bi, Ter wird gekennzeichnet wie viele Substrate an der Hinreaktion bzw. wie viele Produkte an der Rückreaktion beteiligt sind. Ein Mechanismus, bei dem zwei Substrate zu einem Produkt vereinigt werden, ist ein Bi-Uni-Mechanismus.

In dieser Arbeit wird die Reaktionsgleichung für den Random-Bi-Uni-Mechanismus betrachtet, da die (R)-Oxynitrilase nach diesem Mechanismus reagiert. Im Ergebnis und Diskussions-Teil wird näher auf dieses Thema eingegangen.



## 4 Experimenteller Teil

Die Reihenfolge der Versuchsbeschreibungen entspricht der Gliederung des Ergebnis- und Diskussionsteils.

### 4.1 Verwendete Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden entweder von den Firmen FLUKA Feinchemikalien (GmbH, Neu-Ulm), SIGMA-ALDRICH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Schnelldorf), oder der Firma MERCK (Darmstadt) bezogen.

Da Benzaldehyd an der Luft zu Benzoesäure oxidiert, welches ein Inhibitor für die (R)-Oxynitrilase ist, wurde Benzaldehyd unter Stickstoffatmosphäre destilliert und in Fläschchen mit Septum gefüllt.

Die Mandelkleie (Placenta Amygdalarium amararum pulv.) wurde von CAESAR & LORETZ, Hilden, bezogen.

Das Enzym (R)-Oxynitrilase wurde von folgenden Firmen bezogen: ASA (ASA Spezialenzyme GmbH; Braunschweig), ROCHE (Roche Diagnostics GmbH; Penzberg) und SIGMA-ALDRICH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Schnelldorf). Da die Aktivitäten der einzelnen Chargen sich stark von einander unterscheiden, sind im Folgenden die Analysenzertifikate der eingesetzten Enzyme detailliert angegeben.

#### Analysenzertifikat vom ASA Spezialenzym

Produkt:	(R)-Oxynitrilase
Katalognummer:	2700
Chargennummer:	2700-014

Parameter	Ergebnis
Beschreibung:	gelbe Flüssigkeit
Herkunft:	Mandelkleie
spez. Aktivität:	51,0 U/mg Protein
volm. Aktivität:	713,8 U/mL

Proteinkonzentration:	14,0 mg <sub>Protein</sub> /ml
pH-Wert:	5,4
Bemerkung:	Das Präparat enthält 80 mM Na-Citrat, < 10mM KPi und < 3% Glycerin

### **Analysenzertifikat von Roche Diagnostics**

Produkt:	(R)-Oxynitrilase grade I
Chargennummer:	Hö-02/II85852422

<b>Parameter</b>	<b>Ergebnis</b>
Beschreibung:	gelbe Flüssigkeit
Herkunft:	Mandelkleie
spez. Aktivität:	23,4 U/mg <sub>Protein</sub>
volm. Aktivität:	596,7 U/mL
Proteinkonzentration:	25,5 mg <sub>Protein</sub> /mL
pH-Wert:	nicht im Zertifikat aufgeführt
Bemerkung:	nicht im Zertifikat aufgeführt

### **Analysenzertifikat von Sigma-Aldrich**

Produkt:	(R)-Oxynitrilase
Katalognummer:	M6782
Chargennummer:	014H4016

<b>Parameter</b>	<b>Ergebnis</b>
Beschreibung:	gelbe Flüssigkeit
Herkunft:	Mandelkleie
spez. Aktivität:	160 U/mg <sub>Protein</sub>
volm. Aktivität:	560,0 U/mL
Protein:	3,5 mg <sub>Protein</sub> /mL
pH-Wert:	6,0
Bemerkung:	Suspension in 50 mM Imidazol; 2.8 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

## 4.2 Aufbau der Versuchsanlage

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität, der Enantioselektivität und der Langzeitstabilität wurden in einem diskontinuierlichen (Batch-) Reaktor durchgeführt, dessen Aufbau in Abbildung 4-1 schematisch dargestellt ist.

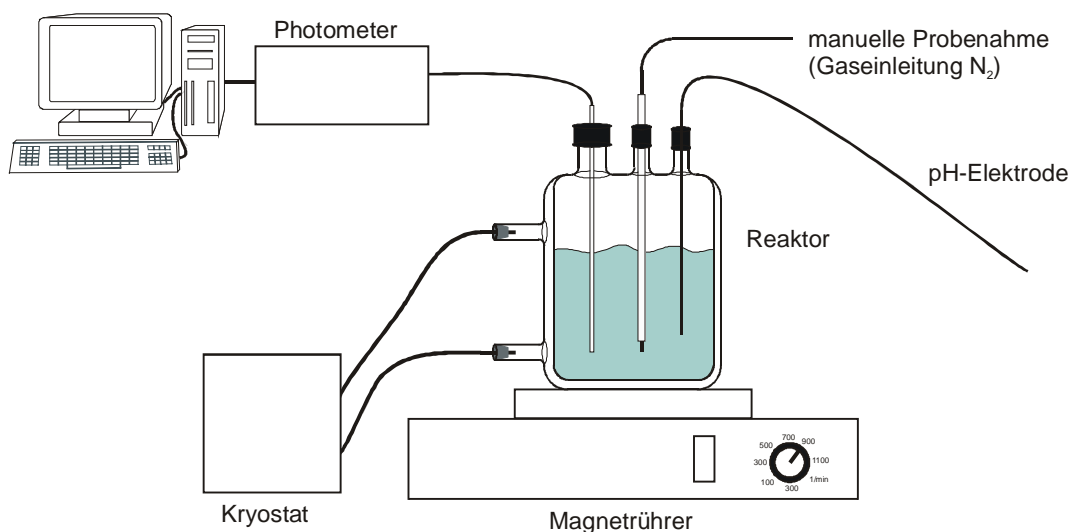


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des verwendeten diskontinuierlich betriebenen Biokatalysator-Teststandes

Der Reaktor besteht aus einem doppelwandigen Glasgefäß mit einem Füllvolumen von 400 ml. Mit Hilfe eines Kryostaten (F25, JULABO, Seelbach) wird die Temperatur der Reaktionslösung während der Reaktion konstant gehalten. Die Durchmischung der Reaktionssuspension erfolgt durch Rühren mit einem Magnetrührer. Mittels einer Glaselektrode wird der pH-Wert der Reaktionssuspension kontinuierlich gemessen. Die Probenahme zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgt über eine Kanüle.

## 4.3 Enzymkatalysierte Synthese und Spaltung von (R)-Cyanhydrin

Um die Anfangsaktivität der jeweiligen Enzyme mit der vom Hersteller angegebenen vergleichen zu können, wurden die gleichen Bedingungen wie die der Hersteller gewählt. Das Enzym von SIGMA und ROCHE wurde von dem Hersteller für die Cyanhydrinsynthese und Cyanhydrinspaltung bei 20°C untersucht. Im Gegensatz zu die-

sen Enzymen wurde das ASA -Enzym für die Cyanhydrinspaltung untersucht. Da die Untersuchungen in diesem Fall bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt wurden, wurden auch in dieser Arbeit die Versuche mit dem ASA-Enzym bei 30°C durchgeführt.

Vor Beginn der Versuchsdurchführung wurden die folgenden Stammlösungen angesetzt:

### **Herstellung einer 50 mM Natriumcitratpufferlösung**

Zur Herstellung der 50 mM Citratpufferlösung benötigt man eine 50 mM Citronensäurelösung (9,6 g Citronensäure auf 1L Wasser) und eine 50 mM tri- Natriumcitrat-2-hydrat-Lösung (14,7 g tri- Natriumcitrat-2-hydrat auf 1 L Wasser). 1 L der 50 mM Citronensäurelösung wird vorgelegt. Der pH-Wert dieser Lösung wird durch Zugabe von der 50 mM tri- Natriumcitrat-2-hydrat-ösung auf 3,75 eingestellt.

### **Herstellung einer 1 M Kaliumcyanidlösung**

Es wird eine 1 M Kaliumcyanid-Stammlösung in 50 mM Citratpufferlösung angesetzt. Dazu werden 6,51 g Kaliumcyanid in 100 mL einer 50 mM Citratpufferlösung gelöst.

### **Herstellung einer 1 mM Benzaldehydlösung**

Hierzu werden 101 µL frisch destilliertes Benzaldehyd in 1 L der 50 mM Citratpufferlösung gelöst.

### **Herstellung einer 1 M (R)-Mandelonitrillösung**

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Cyanhydrinspaltung wird eine 1 M Stammlösung des (R)-Mandelonitrils in Puffer angesetzt. Dazu werden 119 µL Substrat in 1 L Citratpufferlösung gelöst.

#### **4.3.1 Aktivitätstest der Cyanhydrinsynthese mit dem freien Enzym - (SIGMA-, ROCHE- und AAS- Enzym)**

Die Blausäureaddition an Benzaldehyd wird in 50 mM Citratpufferlösung bei einem pH-Wert von 3,75 und bei 20°C durchgeführt. Zu Beginn werden 400 mL Citratpufferlösung im Reaktionsgefäß vorgelegt und mit Hilfe des Kryostaten auf 20°C tempe-

riert. Danach werden zu dieser Lösung 1400  $\mu\text{L}$  der 1 M Kaliumcyanid-Stammlösung hinzugegeben ( $c(\text{CN}^-) = 3,5 \text{ mM}$ ). Anschließend werden die PH-Elektrode und die Sonde in das Reaktionsgefäß gebracht, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung genau auf 3,75 eingestellt wird. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 1 M Natronlauge bzw. von 1 M Salzsäure nachkorrigiert. Anschließend werden 0,36 mg Protein zu der Lösung gegeben. Zum Start der Reaktion wird 40  $\mu\text{L}$  der 1 mM Benzaldehyd-Stammlösung zugegeben ( $c(\text{Benzaldehyd}) = 0,1 \text{ mM}$ ). Die Probenahme zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgt mittels einer Kanüle. Die Weiterreaktion der Proben wird durch Verdünnung der Proben mit einer 50 mM Citratpufferlösung verhindert. Die Ermittlung der Konzentration dieser Proben erfolgt mittels Photometer, GC bzw. HPLC. Die Reaktion wird ca. 30 Minuten beobachtet. Anhand der Bestimmung der Benzaldehydkonzentration wird anschließend die Enzymaktivität ermittelt.

#### **4.3.2 Aktivitätstest der Cyanhydrinspaltung mit dem freien Enzym - (SIGMA-, ROCHE- und AAS- Enzym)**

Die Versuche zur Cyanhydrinspaltung erfolgen ebenfalls bei einem pH-Wert von 3,75. Die Temperatur beträgt in diesem Fall 30°C.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden 400 mL Citratpufferlösung im Reaktionsgefäß vorgelegt und mit Hilfe des Kryostaten auf 30°C temperiert. Danach werden zu dieser Lösung 400  $\mu\text{L}$  der 1 M (R)-Mandelonitril-Stammlösung hinzugegeben ( $c(\text{Mandelonitril}) = 1 \text{ mM}$ ). Anschließend werden die PH-Elektrode und die Sonde in das Reaktionsgefäß gebracht, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung genau auf 3,75 eingestellt wird. Zum Start der Reaktion werden 0,36 mg Protein zur Reaktionslösung zugegeben. Die Probenahme zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgt ebenfalls mittels einer Kanüle. Die Weiterreaktion der Proben wird durch Verdünnung der Proben mit einer 50 mM Citratpufferlösung verhindert. Die Ermittlung der Konzentration dieser Proben erfolgt mittels Photometer, GC bzw. HPLC.

#### **4.4 Analytische Methoden**

Die Analytik chiraler Reaktionen muss zwei Aufgaben erfüllen:

- Bestimmung des Reaktionsfortschritts und
- Ermittlung des Enantiomerenüberschusses

Es gibt verschiedene Analysemethoden zur Bestimmung der Cyanhydrinsynthese. Die Methoden, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, werden im Einzelnen in den folgenden Kapiteln beschrieben.

### **4.4.1 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd**

Die UV-Spektren aromatischer Aldehyde sind geprägt durch die Absorption der Elektronenübergänge im Bereich von 250 bis 320 nm. Die entsprechenden Cyanhydrine zeigen in diesem Bereich keine oder wesentlich geringere Absorptionen. Hierdurch ist es möglich, die Cyanhydrinbildung quantitativ über die Konzentrationsänderung des Aldehyds zu verfolgen. Die photometrische Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd kann sowohl offline manuell als auch online erfolgen.

#### **4.4.1.1 Offline-Messung**

Die photometrische offline-Messung erfolgte mit dem UV/VIS Spektralphotometer (550SE) der Firma PERKIN-ELMER. Die technischen Daten des Spektralphotometers befinden sich im Anhang.

In Abbildung 4-2 ist ein Beispiel UV/VIS-Spektrum von Benzaldehyd und Mandelonitril dargestellt. Aufgetragen ist die Extinktion über die Wellenlänge. Dabei ist zu beachten, dass die Konzentration von Mandelonitril um Faktor Zehn größer ist, als die von Benzaldehyd. Die einzelnen Spektren sind überlappt dargestellt.

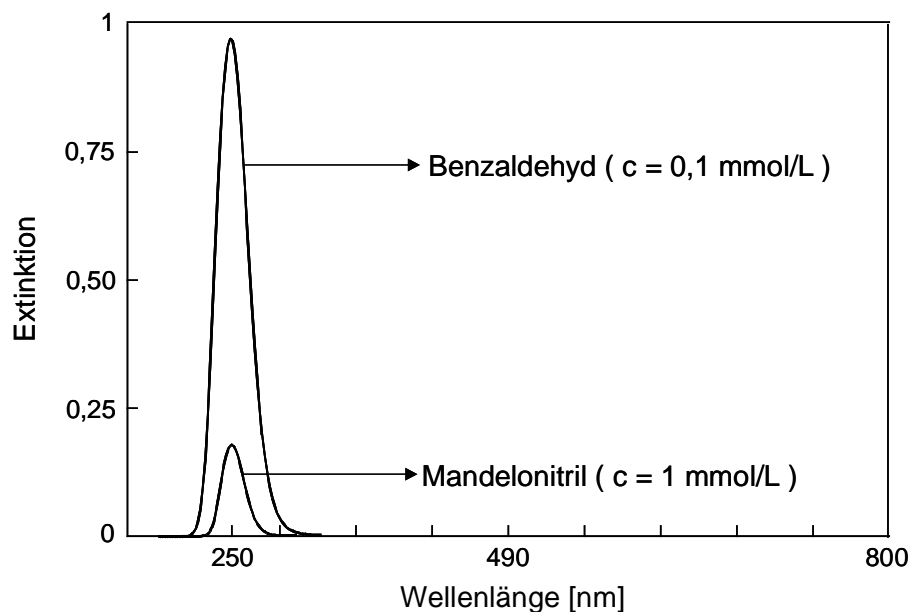


Abbildung 4-2: UV-Spektrum von 0,1 mM Benzaldehyd und 1 mM Mandelonitril in Natriumcitratpuffer, pH 3.75

Aus der Abbildung 4-2 geht hervor, dass Benzaldehyd und Mandelonitril bei der gleichen Wellenlänge (250 nm) absorbieren. Da aber die Extinktion von Mandelonitril im Gegensatz zur Benzaldehyd sehr klein ist, kann sie vernachlässigt werden. Mit Hilfe der offline Messung können nur eine begrenzte Anzahl von Proben erfasst werden. Die Probennahme erfolge alle zwei Minuten. Um aber den Reaktionsverlauf der Cyanhydrinsynthese vollständig beobachten zu können, musste der Verlauf der Reaktion online beobachtet werden.

#### 4.4.1.2 Online-Messung

Die online-Messung erfolgte mit dem UV/VIS Spektralphotometer (SPECORD 40) der Firma JENA-ANALYTIKER. Der Aufbau des Photometers ist in Abbildung 4-3 schematisch dargestellt.

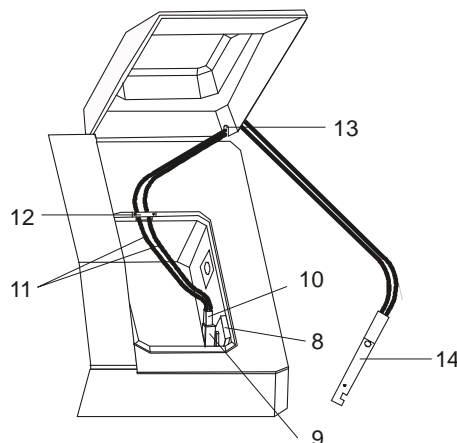


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung der verwendeten On-Line Analytik (besteht aus Photometer mit faseroptischen Sensor; das System wird über den Rechner gesteuert) (8 = Küvettaufnahme, 9 = Adapterhalter, 10 = Adapter, 11 = Faserkabel, 12 = Verschluss in der Lichtbarriere, 13 = Schlitz im Proberaumdeckel, 14 = Tauschsonde)

In Abbildung 4-4 ist der faseroptische Sensor schematisch dargestellt.

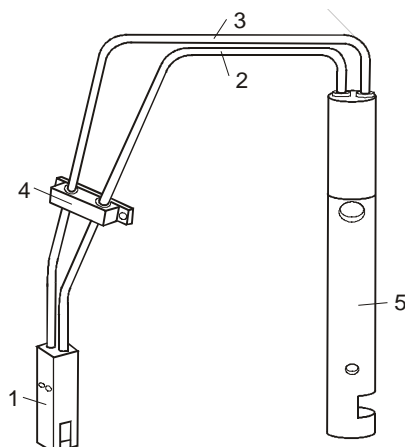


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung des faseroptischen Sensors (1: Adapter zur Lichtein- und -auskopplung, 2: Faserkabel zur Einkopplung, 3: Faserkabel zur Auskopplung, 4: Verschluss für Lichtbarriere, 5: Messsonde)

Mit Hilfe einer Online-Analytik mit direkter Spektrographie über einen faseroptischen Sensor der Firma HELLMER, lässt sich die Cyanhydrinsynthese (Abbildung 4-5) und Cyanhydrinspaltung (Abbildung 4-6) bei 250 nm photometrisch über die Abnahme bzw. Zunahme der Benzaldehydkonzentration verfolgen. Bei der Cyanhydrinsynthese wird von einer Benzaldehydkonzentration von 0,1 mM ausgegangen.



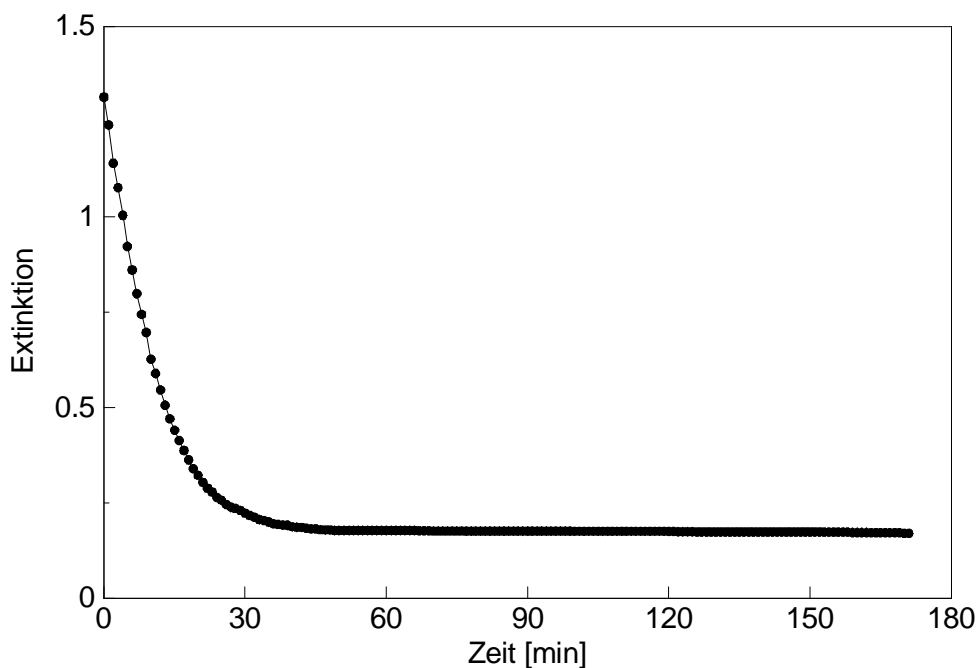


Abbildung 4-5: Photometrische Bestimmung der Benzaldehydkonzentration bei 250 nm mittels Online-Analytik mit direkter Spektrographie über einen faseroptischen Sensor (Cyanhydrinsynthese, pH = 3,75; T = 20°C; 0,36 mg Protein, c(BA) = 0,1 mM)

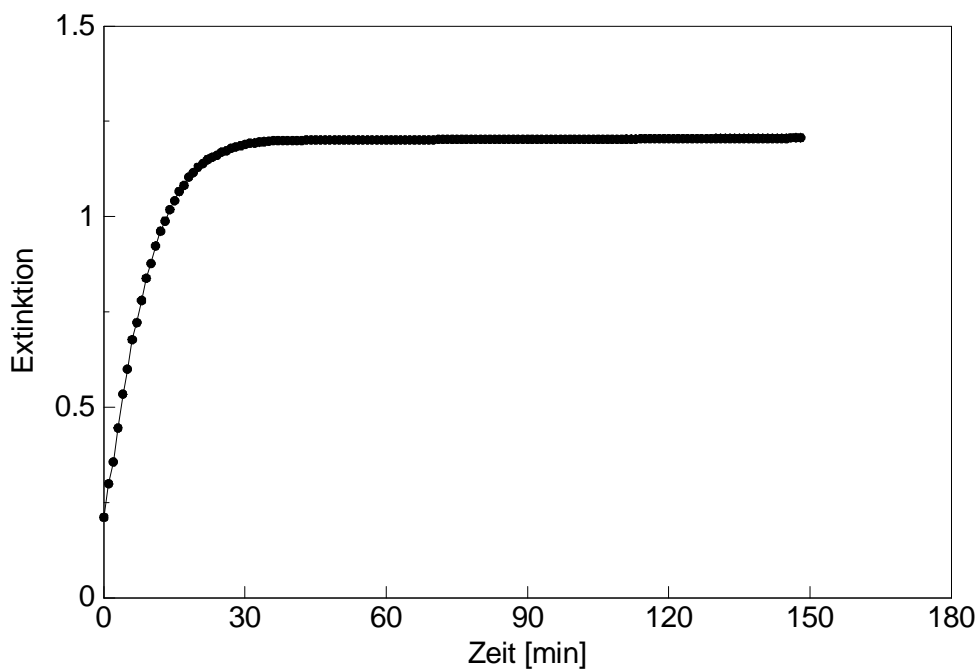


Abbildung 4-6: Photometrische Bestimmung der Benzaldehydkonzentration bei 250 nm mittels einer Online-Analytik mit direkter Spektrographie über einen faseroptischen Sensor (Cyanhydrinspaltung; pH = 3,75; T = 20°C; 0,36 mg Protein; c(MN) = 0,1 mM)

Wie schon erwähnt, zeigen Benzaldehyd und Mandelonitril unterschiedliche Absorptionsintensitäten, daher kann der Extinktionswert für Mandelonitril vernachlässigt werden.

### **Gerätetreiber**

Der Gerätetreiber SPECORD 200 ermöglicht die Kommunikation zwischen der Bedien- und Auswertesoftware Aspect Plus und dem SPECORD 200. Mit seiner Hilfe werden Parameterdateien erstellt und verändert. Diese Dateien enthalten alle für eine spektroskopische Messung erforderlichen Parameter, wie Wellenlänge, Integrationszeit, Messmodus usw.

### **Software**

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt mit dem Programm Aspect Plus. Aspect Plus ist die Windowsversion der Zeiss-Aspect-Software. Sie ermöglicht die Steuerung und die Auswertung der Messergebnisse der Zeiss Geräte MCS 500.

### **Faserkopplung mit Messsonde**

Die Faserkopplung besteht aus dem Adapter, der das Licht aus dem Probenraum auskoppelt und in ein Faserkabel gibt. Dieses Faserkabel leitet das Licht bis zur Messsonde. Ein zweites Faserkabel leitet das in der Messsonde durch die Probe abgeschwächte Licht in den Adapter zurück. Der Adapter koppelt das abgeschwächte Licht wieder in den Messstrahlengang ein.

### **Messsonde**

661.000-QX Standard-Tauchsonde der Firma HELMA

Der Messkopf besteht aus Quarzglas SUPRASIL<sup>®</sup> 300 mit mit Edelstahloberteil und drehbarer Schutzhülse zum Schutz vor Fremdlicht.

### **Maße (Außen)**

Quarzglasmesskopf	15 mm
Edelstahloberteil	18 mm
Schutzhülse	20 mm
Maximale Temperatur:	150°C
Maximaler Druck:	6 bar
Gesamte Länge:	ca. 180 mm

Die Bestimmung der Enantioselektivität ist photometrisch nicht möglich, da die beiden Enantiomere bei gleicher Wellenlänge absorbieren. Sie kann aber chromatographisch mittels GC bzw. HPLC ermittelt werden. Dazu müssen die zu trennenden Enantiomeren mit optisch reinen chiralen Hilfsreagenzien in diastereomere Derivate umgesetzt werden, oder die Enantiomeren zeigen auf einer stationären chiralen Trennphase unterschiedliche Wechselwirkungen mit dieser, so dass eine chromatographische Trennung der optischen Antipoden erfolgt.

#### **4.4.2 Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd und Mandelonitril mittels Gaschromatographie**

Da Mandelonitril bei höheren Temperaturen instabil ist, muss das Produkt vor der Messung mit dem Gaschromatographen (GC) derivatisiert werden.

##### **Derivatisierung von Mandelonitril**

50  $\mu\text{L}$  Rohprodukt (50 %-iges Racemat) werden in 2 mL Dichlormethan gelöst, mit 500  $\mu\text{L}$  Essigsäureanhydrid und 100  $\mu\text{L}$  Pyridin versetzt und mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird über eine Kieselgelsäule (30 mL Kieselgel 60 (für Säulenchromatographie; Korngröße: 0,063-0,200), Säulenvolumen ca. 80 mL; bei Verwendung kleinerer Säulen kann der Ansatz für die Derivatisierung entsprechend reduziert werden) filtriert und mit 30 mL Dichlormethan eluiert. Das Eluat wird gaschromatographisch zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses untersucht. Nach der Derivatisierung des Mandelonitrilstandards ist eine Säulenaufreinigung nicht notwendig, da die Chromatogramme einer aufgereinigten und einer nicht aufgereinigten Probe identisch sind und alle für die Derivatisierung eingesetzten Substanzen nachgewiesen werden können.

##### **GC-Bedingungen**

Gerät:	GC 14A (Fa. Shimadzu)
Probenvolumen:	0,5 $\mu\text{L}$
Split:	100:1
Säule:	permethyliertes $\beta$ -Cyclodextrin (Chiraldex BPM-Säule), 30 m
Säulentemperatur:	150°C

Trärgas:  $\text{H}_2$  (5.0): 1 bar  
Detektor: FID: 230°C  
Brenngase:  $\text{H}_2$ : 0,5 bar; Luft: 0,5 bar  
Injektortemperatur: 220°C

Die Abbildung 4-7 zeigt ein Gaschromatogramm mit den Retentionszeiten von (S)-Mandelonitril und (R)-Mandelonitril.

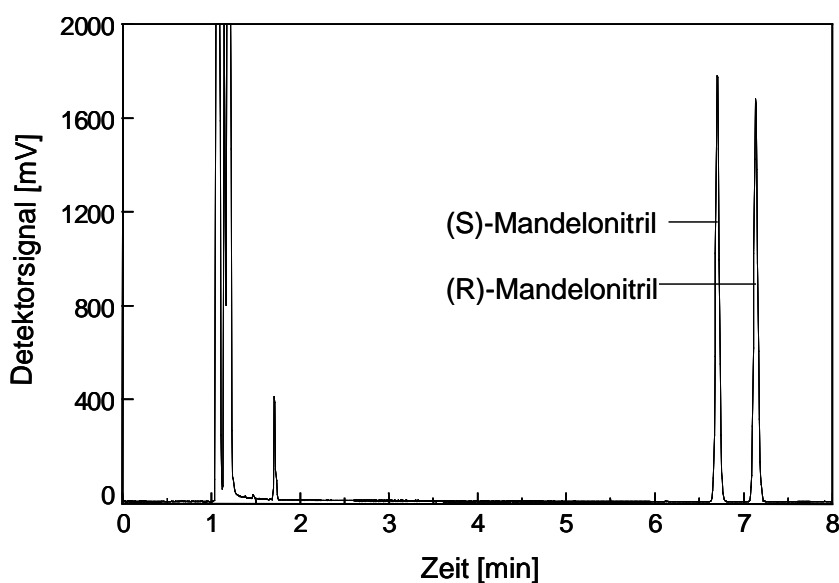


Abbildung 4-7: Gaschromatogramm eines derivatisierten Mandelonitrilstandards; die beiden Enantiomere werden nach 6,70 (S) und 7,13 (R) Minuten detektiert (die ersten Signale sind Dichlormethan, Pyridin und Essigsäureanhydrid)

### 4.4.3 Bestimmung der Konzentration von Benzaldehyd und Mandelonitril mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie

Bei der Trennung der Enantiomeren auf einer chiralen Säule (Chiralpack AD, MERCK EUROLAB) durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) kann direkt auf den Enantiomerenüberschuss der Substanz geschlossen werden. Mit Hilfe dieser Säule konnte sowohl das Racemat als auch Benzaldehyd getrennt werden. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 213 nm (direkte Detektion).

## Gerätedaten und Parameter

<b>Stationäre Phase:</b>	Amylosetris (3,5-dimethylphenyl)carbamate geträgert auf 10 µm Silica-Gel, 0-60°C, 250 x 4,6 mm (L x ID.), Merck Eurolab
<b>Mobile Phase:</b>	n-Hexan/2-Propanol 90/10 (v/v) Flussrate: 1 mL/min Probenvolumen: 20 µL
<b>Detektion:</b>	photometrisch (UV) bei 213 nm (direkte Detektion)
<b>Aufbau:</b>	HPLC-Pumpe: Techlab Economy 2/ED Detektor: Shimadzu UV-VIS-Detektor SPD-6 A
<b>Probenaufgabe:</b>	Autosampler: Spectra Physics SP 8875 Techlab
<b>Retentionszeiten:</b>	(S)-Mandelonitril: 6,79 min (R)-Mandelonitril: 7,41 min
<b>Auswertung:</b>	Shimadzu LC 10 Software über CBM 101

Die Abbildung 4-8 zeigt ein HPLC-Chromatogramm von (S)-Mandelonitril und (R)-Mandelonitril eines 0,5 mM Standards.

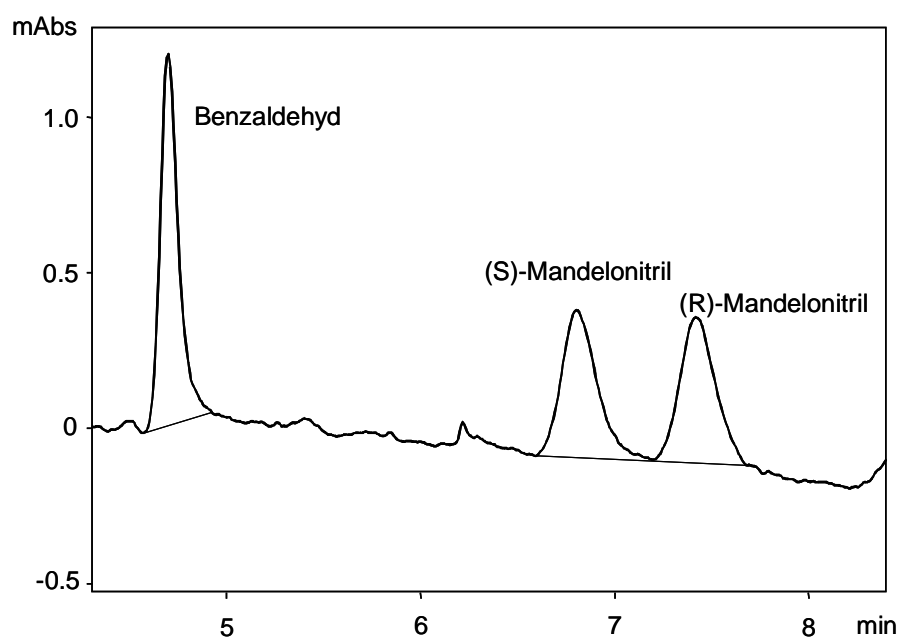


Abbildung 4-8: Chromatogramm von (S)-Mandelonitril und (R)-Mandelonitril;  
RZ: ((S)-Mandelonitril) = 6,79 min und (R)-Mandelonitril = 7,14 min  
c((S)-Mandelonitril) = 0,5 mM und c((R)-Mandelonitril) = 0,5 mM

### 4.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Da die Enzyme der verschiedenen Hersteller unterschiedliche Enzymaktivitäten zeigten, sollte die Reinheit dieser Enzyme mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt werden.

Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit Probenpuffer vermischt, für drei Minuten aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren, und dann jeweils 15-20  $\mu\text{L}$  in die Taschen eines 12%igen Polyacrylamidgels (Fertiggel, Best.-Nr. 161-1101, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien) geladen. Als Standard wurde ein „low-range“-Marker (Best.-Nr. M-3913, SIGMA-CHEMICALS, St. Louis, Missouri) verwendet, der aus acht Proteinen von 6.500 Da bis 66 kDa besteht.

Das Gel lief für 40 min bei 200 V in einem Mini-PROTEAN-II System (BIO-RAD LABORATORIES INC.), wurde dann für 15 min unter leichtem Schwenken im Färbebad kolibriert und anschließend über Nacht entfärbt. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit einer Digitalkamera (Camedia 1400L, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD., Tokyo, Japan).

SDS-Lösung:	100 g/L SDS
Laufpuffer (10 $\times$ ):	144 g/L Tris, 30 g / L Glycin, 100 mL/L SDS-Lösung
Probenpuffer:	2,9 mL H <sub>2</sub> O, 1,6mL 0,5 mol/L Tris-HCl pH 6,8, 2 mL Glycerin, 1,6 mL SDS Lösung, 0,4 mL Mercaptoethanol, 0,1 mL 1 % Bromphenolblau-Lösung
Färbebad:	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 400 mL Methanol, 500 mL H <sub>2</sub> O
Entfärber:	400 mL Methanol, 100 mL Eisessig, 500 mL H <sub>2</sub> O

## 4.5 Kinetische Untersuchung

### 4.5.1 Einfluss der Benzaldehydkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung des Einflusses des Benzaldehyds auf die Enzymaktivität werden Benzaldehydkonzentrationen zwischen 0,1 und 3,5 mM vermessen. 400 mL der 50 mM Citratpufferlösung werden im Reaktionsgefäß vorgelegt und auf 20°C temperiert. Danach werden zu dieser Lösung 0,5 g (7,6 mmol) Kaliumcyanid hinzugegeben ( $c(\text{CN}^-) = 19,2 \text{ mM}$ ). Der pH-Wert der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 1 M

Natronlauge bzw. von 1 M Salzsäure auf 3,75 eingestellt. Nach der Einstellung des pH-Werts werden 1 mg Protein (71  $\mu$ L einer 51 U/mg ASA -Enzymlösung) zu der Lösung gegeben. Zum Start der Reaktion werden die entsprechenden Mengen an Benzaldehyd zugegeben ( $c(\text{Benzaldehyd}) = 0,1$  bis 3,5 mM). Die Probenahme zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgt ebenfalls mittels einer Kanüle. Die Weiterreaktion der Proben wurde durch Verdünnung der Proben mit einer 50 mM Citratpufferlösung verhindert. Die Ermittlung der Konzentration dieser Proben erfolgte mittels Photometer bzw. HPLC. Anhand der Bestimmung der Benzaldehydkonzentration wird anschließend die Enzymaktivität ermittelt. Der gleiche Versuch wird bei einer Anfangskonzentration von 57,6 mM bzw. von 76,8 mM Kaliumcyanid bei sonst gleichen Bedingungen wie oben durchgeführt.

#### **4.5.2 Einfluss der Kaliumcyanidkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit**

Zur Bestimmung des Einflusses von Kaliumcyanid auf die Enzymaktivität werden Kaliumcyanidkonzentrationen zwischen 3,8 mM und 153,6 mM vermessen. 400 mL der 50 mM Citratpufferlösung werden im Reaktionsgefäß vorgelegt und auf 20°C temperiert. Danach werden zu dieser Lösung 40  $\mu$ L frisch destilliertes Benzaldehyd hinzugegeben ( $c(\text{BA}) = 1$  mM). Der pH-Wert der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 1 M Natronlauge bzw. von 1 M Salzsäure auf 3,75 eingestellt. Nach der Einstellung des pH-Werts werden 1 mg Protein (71  $\mu$ L einer 51 U/mg ASA -Enzymlösung) zu dieser Lösung gegeben. Zum Start der Reaktion werden die entsprechenden Mengen (0,1 g; 0,2 g; 0,4 g; 0,5 g; 0,6 g; 0,8 g; 1,5 g; 2 g bzw. 4 g) an Kaliumcyanid zugegeben. Die Probenahme zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgt ebenfalls mittels einer Kanüle. Die Weiterreaktion der Proben wird durch Verdünnung der Proben mit einer 50 mM Citratpufferlösung verhindert. Die Ermittlung der Konzentration dieser Proben erfolgt mittels Photometer bzw. HPLC. Anhand der Bestimmung der Benzaldehydkonzentration wird anschließend die Enzymaktivität ermittelt.

### 4.5.3 Einfluss der Konzentration des Produktes (R)-Mandelonitril auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Der Einfluss des Produktes auf die Enzymaktivität wird bei einer (R)-Mandelonitrilkonzentration von 0,25 bis 5 mM untersucht.

400 mL der 50 mM Citratpufferlösung werden im Reaktionsgefäß vorgelegt und auf 20°C temperiert. 1 g (15,4 mmol) Kaliumcyanid wird in diesen 400 mL gelöst ( $c(\text{CN}^-) = 38,4 \text{ mM}$ ). Der pH-Wert der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 1 M Natronlauge bzw. von 1 M Salzsäure auf 3,75 eingestellt. Nach der Einstellung des pH-Werts werden 1 mg Protein (71  $\mu\text{L}$  einer 51 U/mg ASA -Enzymlösung) zu der Lösung gegeben. Danach werden die entsprechenden Mengen (23,8  $\mu\text{L}$ ; 47,6  $\mu\text{L}$ ; 95,1  $\mu\text{L}$ ; 142,7  $\mu\text{L}$ ; 237,8  $\mu\text{L}$ ; 380,4  $\mu\text{L}$ ; 475,5  $\mu\text{L}$ ) an (R)-Mandelonitril zu der gesamten Lösung gegeben. Zum Start der Reaktion werden jeweils 40  $\mu\text{L}$  frisch destilliertes Benzaldehyd hinzugegeben ( $c(\text{BA}) = 1 \text{ mM}$ ). Die Probenahme zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgt auch hier mittels einer Kanüle. Die Weiterreaktion der Proben wurde durch Verdünnung der Proben mit einer 50 mM Citratpufferlösung verhindert. Die Ermittlung der Konzentration dieser Proben erfolgte mittels Photometer bzw. HPLC. An Hand der Bestimmung der Benzaldehydkonzentration wird anschließend die Enzymaktivität ermittelt.

### 4.6 Immobilisierung von (R)-Oxynitrilase

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. die Immobilisierung von (R)-Oxynitrilase in Hydrogelen untersucht werden. Entsprechend den Ausführungen im einleitenden Abschnitt musste die (R)-Oxynitrilase hierzu zunächst quervernetzt werden. Die Quervernetzung von Enzymen erfolgt durch Reaktion mit Glutardialdehyd und Chitosan. Bei den Versuchen wurden die Parameter Chitosan- und Glutardialdehydkonzentration zur Optimierung variiert. Im folgenden Abschnitt werden die Versuchsvorschriften für die Versuche zur Quervernetzung und Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase beschrieben. Die jeweils angewendeten Parameter sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt.



#### **4.6.1 Einfluss von Glutardialdehyd auf die Enzymaktivität**

Um zu untersuchen, ob das Enzym durch die Reaktion mit Glutardialdehyd geschädigt wird, werden zu 1 mL (36 mg Protein) einer 36,4 mg/mL ASA -Enzymlösung unterschiedliche Mengen (0  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 500  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L) einer 50%-igen Glutardialdehydlösung gegeben. Die Quervernetzung des Enzyms erfolgt bei einem pH-Wert von 5,5. Da die Enzymlösung einen pH-Wert von 5,4 hat, muss der pH-Wert nicht nachkorrigiert werden. Bei Zugabe von GDA zu der Enzymlösung fällt durch die Quervernetzung ein sehr feiner Niederschlag aus, welchen man nicht durch Zentrifugieren abtrennen kann. Aus diesem Grund wird die gesamte Lösung der Quervernetzung auf Aktivität getestet. Da es nicht möglich ist, das quervernetzte Enzym von der Lösung abzutrennen, soll das Molekulargewicht des Enzyms noch weiter vergrößert werden. Die Molekularvergrößerung soll durch die Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und GDA erfolgen.

#### **4.6.2 Einfluss des Chitosans auf die Enzymaktivität**

Bevor das Enzym mit Chitosan und GDA coquervernetzt wird, muss überprüft werden, wie sich unterschiedliche Konzentrationen an Chitosan („fine grade“ Produkt, Batch-No. TM578, PRIMEX INGREDIENTS, Avaldsnes, Norwegen) auf die Enzymaktivität auswirken. Wichtig für diese Untersuchung ist die Viskosität der Chitosanlösung, da eine homogene Mischung aus Chitosan und Enzym hergestellt werden soll.

##### **Herstellung der Chitosanlösung**

1,5 g Chitosan („fine grade“ Produkt, Batch-No. TM578, PRIMEX INGREDIENTS, Avaldsnes, Norwegen) werden in 98,5 mL einer 0.5%-igen Essigsäure unter starkem Rühren gelöst. Danach wird der pH-Wert langsam durch Zugabe von 1 M Natronlauge auf 5,5 eingestellt. Da bei der Titration lokal höhere pH-Werte auftreten, fällt während dieses Vorgangs Chitosan in weißen, dicken Fäden aus, die sich unter Rühren nach einiger Zeit wieder lösen.

Um zu untersuchen, ob das Enzym durch Zugabe von Chitosan geschädigt wird, werden zu 1 mL (36 mg Protein) einer 36,4 mg/mL ASA-Enzymlösung unterschiedliche Mengen (0 – 2 g) einer 1,5%-igen Chitosanlösung gegeben. Die gesamte Lösung wird 16 h bei 4°C gerührt und anschließend auf Aktivität getestet.

#### **4.6.3 Coquervernetzung des Enzyms durch Chitosan und Glutardialdehyd**

1,65 mL (60 mg Protein) einer 36,4 mg/mL ASA-Enzymlösung werden mit 4 g der 1,5%-igen Chitosanlösung (60 mg Chitosan) vermischt und anschließend unter ständigem Rühren mit unterschiedlichen Mengen (0  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 500  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L) einer 50%-igen Glutardialdehydlösung versetzt. Der pH-Wert, bei dem die Coquervernetzung erfolgt, ist auch hierbei durch die Chitosanlösung mit 5,5 vorgegeben. Die Coquervernetzung erfolgt in 16 h bei 4°C. Nach Beendigung der Coquervernetzung wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert. Sowohl das Pellet als auch der Überstand werden auf Aktivität getestet.

#### **4.6.4 Einschluss des molekulargewichtsvergrößerten Enzyms in Polyvinylalkohol**

Das mit Chitosan und GDA molekulargewichtsvergrößerte Enzym wird abzentrifugiert, das Pellet wird anschließend in Polyvinylalkohol eingeschlossen. Dazu wird die gebrauchsfertige Polymerlösung LentiKat<sup>®</sup>Liquid nach Vorschrift vorbereitet (genia-Lab GmbH, Braunschweig). 80 mL LentiKat<sup>®</sup>Liquid werden in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Nach vollständigem Lösen des PVAs wird die Polymerlösung auf ca. 30°C abgekühlt. Anschließend wird das molekulargewichtsvergrößerte Enzym mit Wasser auf 20 g Gesamtmasse aufgefüllt und zu der Polymerlösung gegeben. Durch kurzes Schütteln und nachfolgendes Rühren (3 Minuten) auf einem Magnetrührer wird das molekularvergrößerte Enzym gleichmäßig dispergiert. Anschließend wird die enzymbeladene Lösung zu LentiKats<sup>®</sup> weiterverarbeitet. In Abbildung 4-9 ist das Verfahren der Coquervernetzung des Enzyms und das Verfahren des Einschlusses des molekulargewichtsvergrößerten Enzyms schematisch dargestellt.

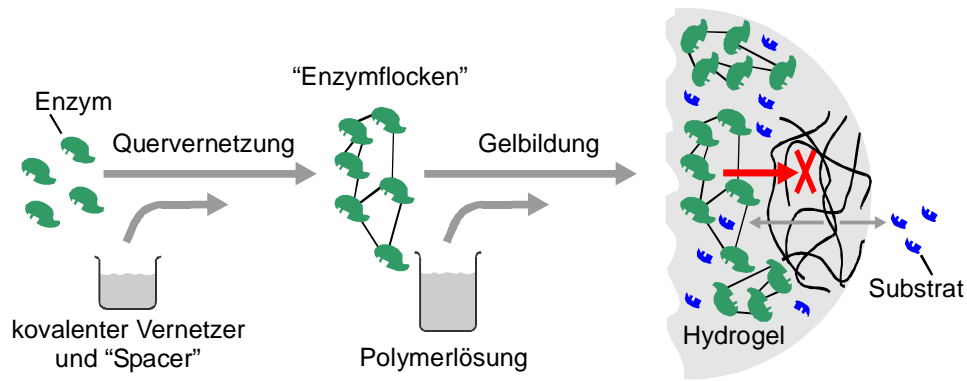


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der Coquervernetzung der (R)-Oxynitrilase mit Chitosan und Glutardialdehyd und des Einschlusses des molekulargewichtsvergrößerten Enzyms

#### 4.6.5 Herstellung von LentiKats®

Zur Herstellung von LentiKats® wird grundsätzlich das mit der Enzymlösung vermischte LentiKat® Liquid auf eine glatte Oberfläche aufgetropft. Erst durch kontrollierte Trocknung der Tropfen erfolgt die Gelierung. Nachdem die Tropfen getrocknet sind, werden sie anschließend in wässriger Stabilizerlösung zurückgequollen und gleichzeitig stabilisiert [101].

Das Auftropfen kann auf verschiedene Art und Weise mit sehr unterschiedlichem Aufwand und Maßstab durchgeführt werden. In Abbildung 4-10 ist die Herstellung der LentiKats® durch Auftropfen der Lösung auf eine glatte Oberfläche mit einer Spritze dargestellt.

##### 4.6.5.1 Herstellung mit Spritze und Kanüle

Bei dieser einfachen Art der Herstellung wird die enzymbeladene Polymerlösung mittels einer Spritze mit Kanüle auf eine Kunststoffplatte getropft und dort bis zum Erreichen einer Restmasse von etwa 30 % getrocknet. Das Verfahren ist in Abbildung 4-10 schematisch dargestellt. Die trockenen Partikel werden anschließend mit Stabilizerlösung übergossen und von der Oberfläche abgeschabt. Mit dem Übergießen werden die Linsen zurückgequollen und gleichzeitig stabilisiert. Anschließend werden die Linsen in ein Gefäß überführt, mit Stabilizerlösung übergossen und im Kühlschrank gelagert.

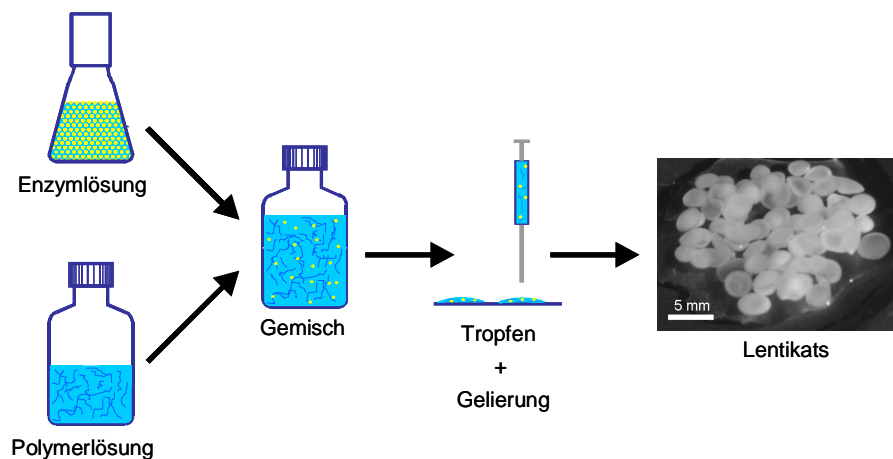


Abbildung 4-10: Herstellung von PVA-Gelen (Lentikats®)

#### 4.6.5.2 Herstellung von Lentikats® mit dem LentiKat®Printer

Um unter definierten Bedingungen reproduzierbar kleinere Mengen an Lentikats® im Bereich von 1 bis 50 g herstellen zu können, werden die Lentikats® mit dem LentiKat®Printers (geniaLab GmbH) hergestellt. In Abbildung 4-11 sieht man das Foto eines LentiKat®Printer, rechts von dem Printer ist der Stahlstift separat abgebildet.

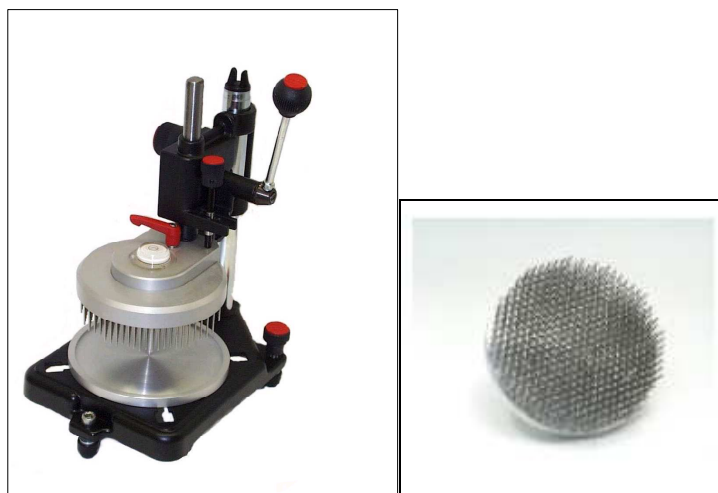


Abbildung 4-11: Apparat zur reproduzierbaren Herstellung von kleineren Mengen an Lentikats®: links: Gesamtansicht, rechts: Auftropfeinheit mit etwa 400 massiven Stahlstiften. Foto des LentiKat®Printers

#### 4.6.5.3 Funktionsprinzip des LentiKat® Printers

Das Funktionsprinzip des LentiKat® Printers ist einfach: Ein Stahlstift wird kurzzeitig in eine Polymerlösung eingetaucht. Beim Herausziehen bleibt Flüssigkeit haften, die sich als Tropfen am unteren Ende des Stiftes sammelt. Dieser Tropfen wird durch Aufsetzen des Stahlstiftes auf eine glatte Oberfläche überführt und geliert zu einem linsenförmigen Hydrogel. Für die Herstellung der Linsen wird das quervernetzte, abzentrifugierte Enzym mit 80 g LentiKat® Liquid vermischt und in Einmalpetrischalen (GREINER Labortechnik GmbH, Nürtingen) (Ø 145 mm) aus Polystyrol gefüllt. In das Polymer werden die Stahlstifte mit dem Printer abgesenkt, angehoben und die anhaftenden Tropfen in den Deckel der Petrischale abgesetzt (Stempeln). Mit dem LentiKat® Printer können pro Arbeitsschritt ca. 400 identische Tröpfchen auf eine Petrischale übertragen werden. Die mit Tropfen besetzten Platten werden zum Trocknen unter einen Ventilator gestellt. Werden für einen Ansatz mehrere Deckel bestempelt, kann durch vorübergehendes Abdecken mit einem Schalenboden der Trocknungsbeginn verzögert werden, bis alle Deckel bestempelt sind. Anschließend werden alle Platten gleichmäßig getrocknet, bis eine bestimmte Menge der aufgetropften Polymerlösung verdunstet ist. Die Linsen werden bis zum Erreichen einer Restmasse von 30 % getrocknet. Der Trocknungsvorgang wurde durch Wiegen der Platten kontrolliert und bei Erreichen der Zielmasse durch Übergießen der Linsen mit Stabilisierungslösung abgestoppt. Nach einer Dauer von etwa 3 Minuten wird der Überstand abgegossen, die fertigen LentiKats® lassen sich mühelos mit einem Gummiwischer zusammenschieben und in eine Flasche mit Stabilisierungslösung überführen. Die LentiKats® sind bei einem Durchmesser von 4 mm in der Mitte ca. 300 µm dick.

#### 4.6.5.4 Nachbereitung der LentiKats®

Das Übergießen der Linsen nach der kontrollierten Trocknung mit Flüssigkeit erfüllt verschiedene Aufgaben:

- Definierte Beendung des Trocknungsvorganges
- Rückquellen und Aufbau der Hydrogelstruktur
- Stabilisierung der Polymerstruktur
- Waschen der Hydrogelpartikel

## 4.7 Ideale Immobilisierungsmethode für (R)-Oxynitrilase

Bei den Vorversuchen hat sich für die Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase die folgende ideale Immobilisierungsmethode ergeben. Die Immobilisierung des Enzyms erfolgt in drei Schritten.

### 1. Schritt: Molekularvergrößerung des Enzyms durch Chitosan und GDA

1,65 mL (60 mg Protein) einer 36,4 mg/mL ASA-Enzymlösung werden mit 4 g der 1,5%-igen Chitosanlösung (60 mg Chitosan) vermischt und anschließend unter ständigem Rühren mit 200 µL einer 50%-igen Glutardialdehydlösung versetzt. Bei Zugabe von GDA fallen große Flocken aus. Der pH-Wert bei dem die Coquervernetzung erfolgt, ist durch die Chitosanlösung mit 5,5 vorgegeben. Die Coquervernetzung erfolgt in 16 h bei 4°C. Nach Beendigung der Coquervernetzung wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert. Anschließend wird das molekularvergrößerte Enzym (Pellet) in Polyvinylalkohol eingeschlossen.

### 2. Schritt: Einschluss des molekularvergrößerten Enzyms in Polyvinylalkohol

Das mit Chitosan und GDA molekularvergrößerte Enzym wird anschließend in Polyvinylalkohol eingeschlossen. Dazu werden 80 mL der gebrauchsfertigen Polymerlösung LentiKat®Liquid (geniaLab GmbH, Braunschweig) nach Vorschrift vorbereitet. Dazu wird die gebrauchsfertige Polymerlösung LentiKat®Liquid nach Vorschrift vorbereitet (geniaLab GmbH, Braunschweig). 80 mL LentiKat®Liquid werden in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Nach vollständigem Lösen des PVAs wird die Polymerlösung auf ca. 30°C abgekühlt. Anschließend wird das molekularvergrößerte Enzym mit Wasser auf 20 g Gesamtmasse aufgefüllt und zu der Polymerlösung gegeben. Durch kurzes Schütteln und nachfolgendes Rühren (3 Minuten) auf einem Magnetrührer wird das molekularvergrößerte Enzym gleichmäßig dispergiert. Anschließend wird die enzymbeladene Lösung zu LentiKats® weiterverarbeitet.

### 3. Schritt: Herstellung von LentiKats® mit dem LentiKat®Printer

Für die Herstellung der Linsen wird das molekularvergrößerte Enzym mit 80 g LentiKat®Liquid vermischt und in Einmalpetrischalen (GREINER Labortechnik GmbH, Nürtingen) (Ø 145 mm) aus Polystyrol gefüllt. In das Polymer werden die Stahlstifte mit dem Printer abgesenkt, angehoben und die anhaftenden Tropfen in den Deckel der Petrischale abgesetzt (Stempeln). Mit dem LentiKat®Printer können pro Arbeitsschritt

ca. 400 identische Tropfchen auf eine Petrischale übertragen werden. Die mit Tropfen besetzten Platten werden zum Trocknen unter einen Ventilator gestellt. Anschließend werden die Linsen bis zum Erreichen einer Restmasse von 30% getrocknet. Der Trocknungsvorgang wurde durch Wiegen der Platten kontrolliert und bei Erreichen der Zielmasse durch Übergießen der Linsen mit der Stabilisierungslösung abgestoppt. Nach einer Dauer von etwa 3 Minuten wird der Überstand abgegossen. Die fertigen LentiKats® lassen sich mühelos mit einem Gummiwischer zusammenschieben und in eine Flasche mit Stabilisierungslösung überführen.





## 5 Ergebnisse und Diskussion

Das entscheidende Argument für den Einsatz von Enzymen in Synthesen ist deren Chemo-, Regio-, und Enantioselektivität. Die Selektivität wird im Wesentlichen durch die sterischen Verhältnisse am aktiven Zentrum der Enzyme ermöglicht. Die Herstellung enantiomerenreiner Substanzen stellt besonders für die pharmazeutische Industrie, welche seit dem so genannten Contergan<sup>®</sup>-Skandal strengerer gesetzlichen Auflagen unterliegt, eine große Herausforderung dar. Thalidomid, der Wirkstoff des Medikaments Contergan, ist ein chirales Phthalimidoglutarimid, welches als racemisches Gemisch verabreicht wurde (Abbildung 5-1).

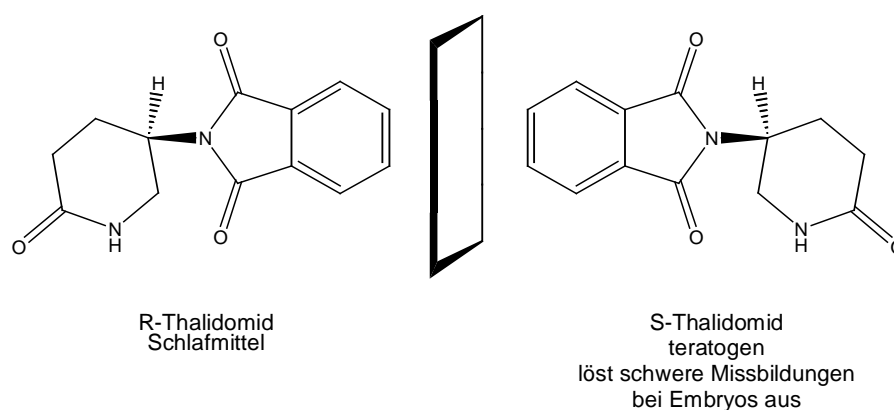


Abbildung 5-1: Strukturformel von Contergan<sup>®</sup>

Es konnte festgestellt werden, dass nur das (R)-Enantiomer für die beruhigende Wirkung des Contergans, und nur das (S)-Enantiomer für die teratogene Wirkung verantwortlich ist.

Auch zur Darstellung von Aromen und Lebensmittelzusätzen ist eine Enantiomerenreinheit oft erforderlich, da die unterschiedlichen Enantiomere sich in ihren Eigenschaften grundlegend unterscheiden können. Mittlerweile haben sich verschiedene Enzymkatalysen zur Darstellung chiraler Moleküle industriell etabliert [112].

Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind chirale Cyanhydrine beispielsweise mittels der enzymkatalysierten Addition von Blausäure an Aldehyde und Ketone durch Oxynitrilasen darzustellen [151-153]. Sie besitzen ein erhebliches Synthesepo-

tential, da sie leicht in Substrate umgewandelt werden können, von denen eine große Zahl pharmazeutisch wirksam sind [3-18].

Bei der Synthese optisch aktiver Cyanhydrine ist eine ökonomische Herstellung der Zielmoleküle in hohen Ausbeuten und mit großer Enantioselektivität unter Minimierung der Kosten, insbesondere der des Enzyms, von grundlegender Bedeutung. Auf diesem Sachverhalt basierend sollte eine Immobilisierungsmethode für die (R)-Oxynitrilase entwickelt werden.

### **5.1 Enzymatische und nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese**

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen ist, dass die Unterdrückung der spontanen Cyanhydrinbildung unter gleichzeitiger Ausbildung der enzymatisch gebildeten Cyanhydrine in weitem Umfang erreicht wird. Als wirksamstes Mittel stellt sich eine pH-Wert Minderung des Reaktionsmediums dar, da hierdurch die spontane Reaktion unterdrückt und somit der Anteil der enzymatischen Reaktion am Gesamtumsatz erhöht werden kann.

Die anfänglichen Untersuchungen dieser Arbeit stützen sich weitgehend auf Arbeiten von EFFENBERGER ET AL. Aus diesen Veröffentlichungen geht hervor, dass die enzymatische Cyanhydrinsynthese in wässriger Lösung signifikant vom pH-Wert abhängt. So steigen die Enantiomerenüberschüsse beim Übergang von pH 5,4 auf 3,5 von etwa 40 bis 50% auf über 90% an. Die Ursache für diesen Effekt ist, dass bei pH-Werten von vier oder niedriger die nichtenzymatische unselektive Cyanhydrinsynthese, die parallel zu der enzymatischen Reaktion verläuft, nicht mehr oder nur geringfügig abläuft [98]. Allerdings ist zu beachten, dass die Enzyme im im aciden pH-Bereich an Aktivität und an Stabilität verlieren, daher ist ein möglichst hoher pH-Wert anzustreben.

#### **5.1.1 Nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese**

Zur Optimierung des Systems war es daher erforderlich, genaue Kenntnisse über den jeweiligen Anteil der enzymatischen und der nichtenzymatischen Reaktion zu erhalten. Über eine Variation der Reaktionsparameter, insbesondere des pH-Werts, sollte

die Reaktion anschließend so gelenkt werden, dass maximale Enantiomerenüberschüsse und chemische Ausbeuten erhalten werden.

Laut EFFENBERGER et al. führt die enzymatische Reaktion bei einem pH-Wert von 3,75 zu optisch reinen Cyanhydrinen. Um nachzuweisen, dass die nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese im Vergleich zur enzymatischen tatsächlich bei dem pH-Wert von 3,75 unterdrückt wird, wurde zunächst die nichtenzymatische Blausäureaddition an Benzaldehyd bei diesem niedrigen pH- Wert in rein wässrigem Natriumcitratpuffer bei 20°C durchgeführt.

Dazu wurde die nichtenzymatische Cyanhydrinsynthese bei in rein wässrigem Natriumcitratpuffer durchgeführt. Die Konzentration von Benzaldehyd war 0,1 mM, die von HCN 3,5 mM. Der Reaktionsverlauf dieser Synthese wurde photometrisch verfolgt, da die Absorptionsintensitäten von Benzaldehyd und von Cyanhydrin sehr unterschiedlich sind (Abbildung 4-2).

Bei der Auftragung der Extinktion über die Wellenlänge wird deutlich, dass sowohl das Maximum von Benzaldehyd als auch das von Mandelonitril bei einer Wellenlänge von 250 nm liegt. Die Absorptionsintensität des Benzaldehyds ist aber viel größer als die des Mandelonitrils. Dabei ist zu beachten, dass bei diesem Experiment die Konzentration von Mandelonitril um den Faktor 10 größer ist als die von Benzaldehyd.

Bei der nichtenzymatischen Cyanhydrinsynthese wurden zu unterschiedlichen Reaktionszeiten Proben genommen und diese photometrisch bei einer Wellenlänge von 250 nm vermessen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der folgenden Abbildung dargestellt. In diesem Fall wurde die Extinktion über die Zeit aufgetragen (Abbildung 5-2).

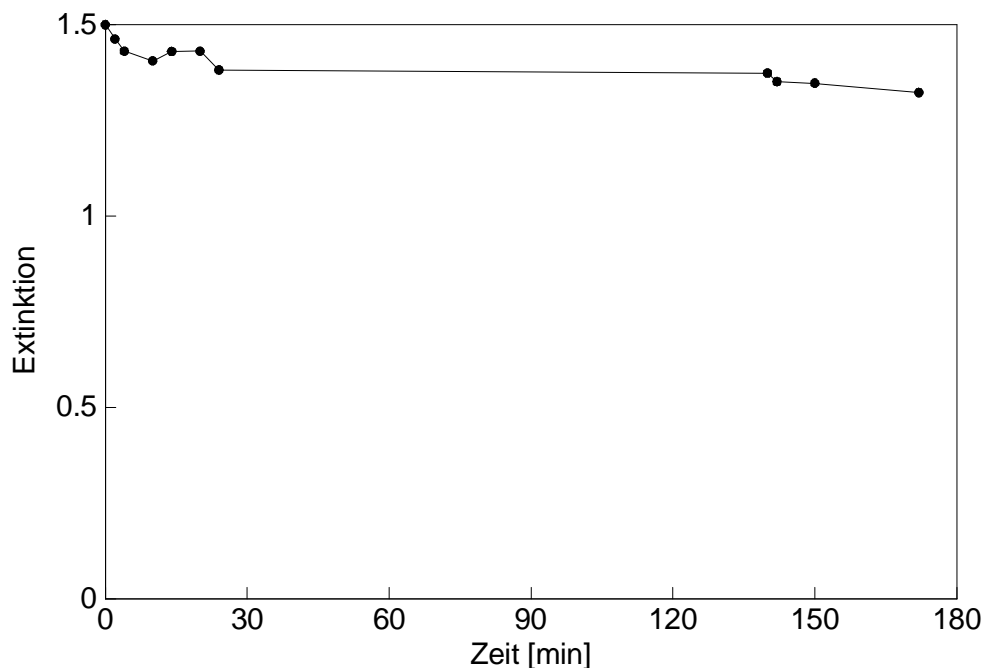


Abbildung 5-2: Photometrischer Verlauf der nichtenzymatischen Cyanhydrinsynthese (pH = 3,75; T = 20°C; c(BA) = 0,1 mM; c(KCN) = 3,5)

Aus der Abbildung 5-2 geht hervor, dass die Extinktion des Benzaldehyds sich während einer Versuchszeit von ca. 4,5 Stunden weniger als 10 % ändert. Damit wurde gezeigt, dass unter diesen Reaktionsbedingungen eine Zurückdrängung der zu racemischen Cyanhydrinen führenden nichtenzymatischen Blausäureaddition erreicht werden kann. Obwohl die nichtenzymatischen Cyanhydrinsynthese bei diesem pH-Wert messtechnisch nicht mehr zu erfassen ist, muss man sie dennoch beachten, wenn durch die enzymatische Reaktion optisch sehr reine Cyanhydrine dargestellt werden sollen.

Um einen weiteren Einblick in das Reaktionssystem zu bekommen, wurde zunächst die pH-Abhängigkeit der Racemisierung von Mandelonitril untersucht.

### 5.1.2 Racemisierung des chiralen Cyanhydrins

Bei der asymmetrischen Cyanhydrinsynthese wird der Enantiomerenüberschuss nicht allein durch das Verhältnis von asymmetrischer und symmetrischer Reaktion be-

stimmt, sondern auch durch die in situ stattfindende Racemisierung der gebildeten chiralen Cyanhydrine (Abbildung 5-3) bestimmt.

Am asymmetrischen  $\alpha$ -Kohlenstoff sind sowohl das direkt gebundene H-Atom als auch das H-Atom der Hydroxylgruppe durch den elektronenziehenden Effekt der Nitrilgruppe acide [106].

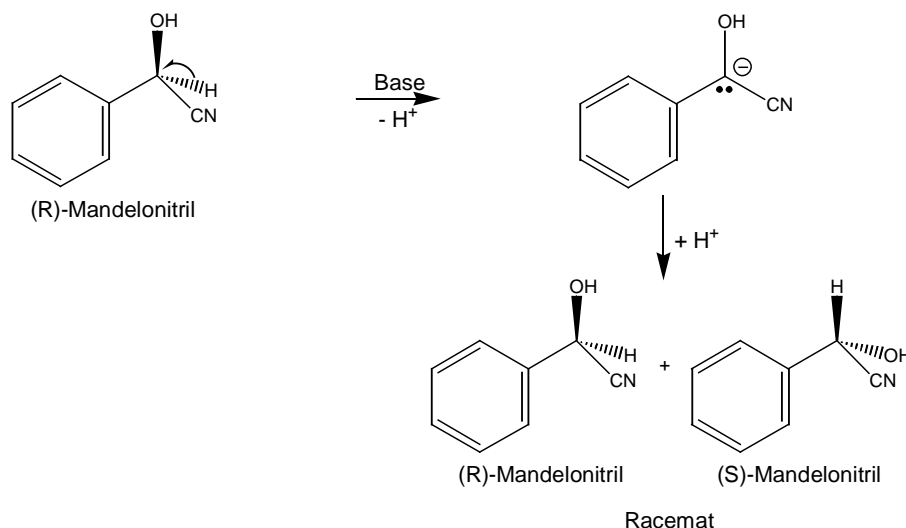


Abbildung 5-3: Mechanismus der Racemisierung von Mandelonitril

Um zu überprüfen, in wie weit der ee-Wert von der Racemisierung abhängt, wurde der folgende Versuch durchgeführt:

Es wurde eine 1 mM Mandelonitrillösung (50 %-iges Gemisch der Enantiomeren (R) und (S)) hergestellt und diese bei einem pH-Wert von 3,75 sechs Stunden bei 20°C gerührt. Die Konzentration der Enantiomere wurde mittels enantioselektiver HPLC über die Reaktionszeit verfolgt. In Abbildung 5-4 ist der Reaktionsverlauf der Racemisierung von Mandelonitril dargestellt, aufgetragen ist die Konzentration von (S)-Mandelonitril über die Reaktionszeit.

Aus der Abbildung 5-4 erkennt man, dass die Konzentration von (S)-Mandelonitril während einer Reaktionsdauer von fünf Stunden konstant bleibt. Hiermit ist gezeigt, dass die Racemisierung bei dem gewählten pH-Wert unterdrückt wird.

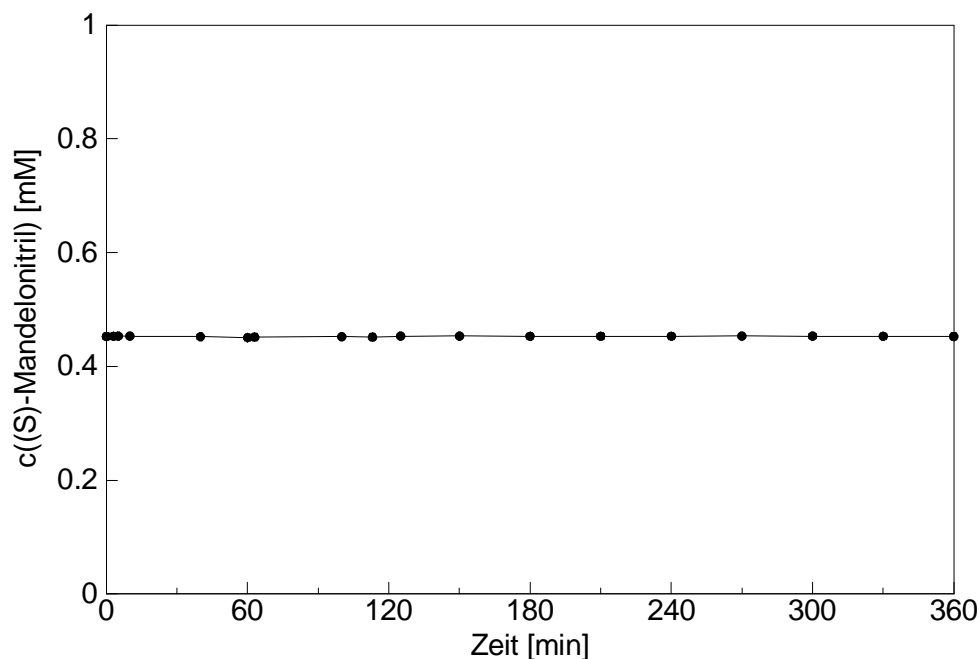


Abbildung 5-4: Reaktionsverlauf der Racemisierung von (R)-Mandelonitril (pH = 3,75; T = 20°C; c(MN) = 1 mM)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einem pH-Wert von 3,75 sowohl die chemische Cyanhydrinbildung als auch die Racemisierung von (R)-Mandelonitril zum (S)-Enantiomer nicht stattfinden.

Jetzt ist von besonderem Interesse, wie sich die spezifischen Enzymparameter- Aktivität und Stabilität - unter den gewählten Reaktionsbedingungen verhalten. Es ist also zu prüfen, ob sich unter diesen Bedingungen die enzymatische Cyanhydrinsynthese ökonomisch durchführen lässt.

### 5.1.3 Enzymatische Cyanhydrinsynthese

Erste orientierende Untersuchungen zur enzymatischen Cyanhydrinsynthese wurden mit der (R)-Oxynitrilase der Firma SIGMA-ALDRICH (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH; Schnellendorf) durchgeführt. Die Enzymmenge ( $m_{\text{Protein}} = 0,36 \text{ mg}$ ) wurde so gewählt, dass die Reaktion in 30 bis 60 Minuten beendet war. Die Konzentrationsänderung des Benzaldehyds wurde auch in diesem Fall photometrisch bei 250 nm verfolgt (Abbildung 5-5).

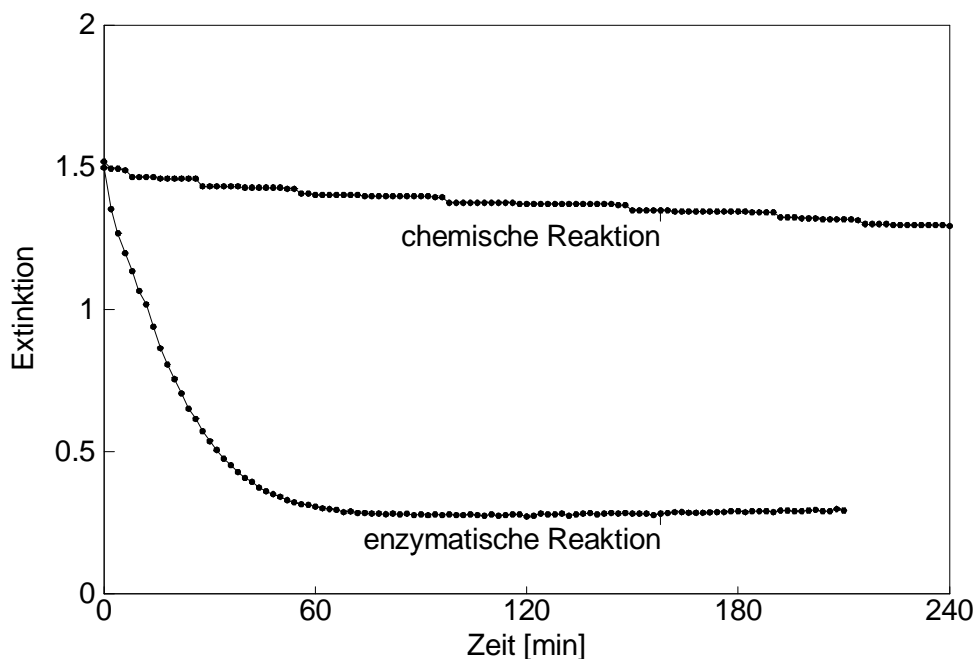


Abbildung 5-5: Photometrischer Verlauf der nichtenzymatischen und der enzymatischen Cyanhydrinsynthese (pH = 3,75; T = 20°C; c(BA) = 0,1 mM; c(KCN) = 3,5 mM)

Betrachtet man den Konzentrationsverlauf in dem enzymatischen Ansatz, so erkennt man, dass die Benzaldehydkonzentration in den ersten 30 Minuten der Reaktion stark abnimmt. Im weiteren Reaktionsverlauf nimmt die Umsatzgeschwindigkeit ab, bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Im Vergleich zur enzymatischen Reaktion ist der Umsatz der nichtenzymatischen Synthese in den ersten 30 Minuten sehr klein, so dass die spontane Cyanhydrinsynthese bei dem pH-Wert von 3,75 hinreichend diskriminiert ist.

## 5.2 Variation der Cyanidquelle

Cyanwasserstoff (HCN) ist eine farblose, äußerst giftige (MAK 11 mg/m<sup>3</sup>) Flüssigkeit von charakteristischem Geruch (Mandelgeruch). Aufgrund des pK-Wertes von 9,4 und des Siedepunktes von 25,8°C der Blausäure treten beim Arbeiten mit anorganischem Cyanid unter physiologischen Bedingungen prinzipielle Schwierigkeiten in der Aufrechterhaltung der Cyanidkonzentration bzw. der Konstanthaltung des pH-Wertes auf. Die Toxizität von flüssiger und gasförmiger Blausäure (die tödliche Dosis liegt bei

1 mg CN-/kg Körpergewicht) kommt durch Blockierung des 3-wertigen Eisens der Cytochromoxidase zustande, was ein rasches Ersticken bewirken kann.

Aufgrund der oben aufgeführten negativen Eigenschaften von Cyanwasserstoff wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, Blausäure durch gefahrlos handhabbare Cyanid-Quellen zu ersetzen. Beispielsweise kann sie gegen Acetoncyanhydrin austauscht werden (Abbildung 5-6).

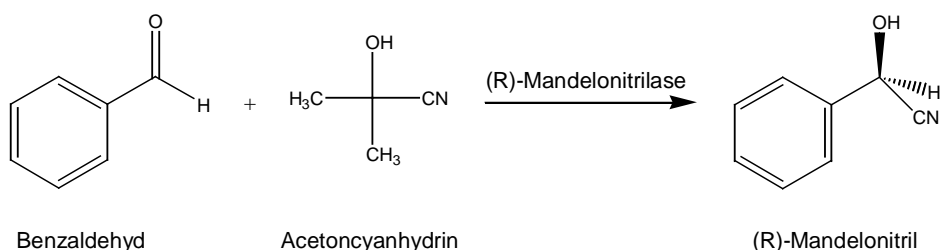


Abbildung 5-6: Reaktionsgleichung der enzymatischen Cyanhydrinsynthese mit Acetoncyanhydrin als Edukt

Bei diesen Versuchen wurde Benzaldehyd im wässrigen Medium bei dem pH-Wert von 3,75 mit Acetoncyanhydrin als Cyanidquelle enzymatisch umgesetzt. Die Konzentrationsänderung des Benzaldehyds während der Reaktion wurde dabei photometrisch verfolgt (Abbildung 5-7). Aus Abbildung 5-7 geht hervor, dass sich die Konzentration des Benzaldehyds über eine Zeit von ca. 21 Stunden nur wenig ändert. Damit ist gezeigt, dass Acetoncyanhydrin unter diesen Reaktionsbedingungen nur langsam mit Benzaldehyd reagiert. Auch eine Variation des pH-Werts und der Temperatur brachte keinen Erfolg.



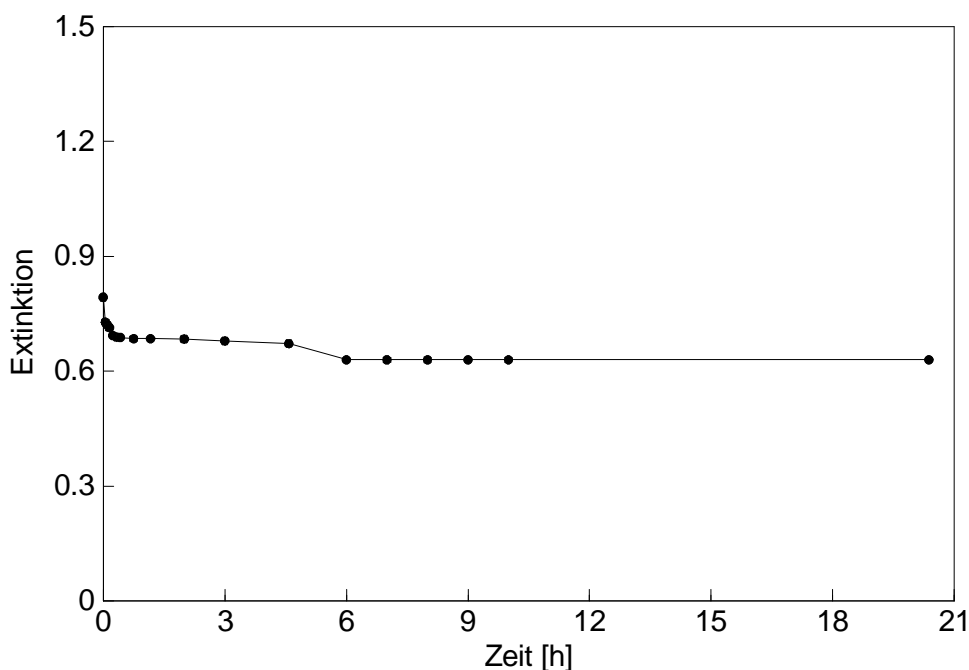


Abbildung 5-7: Enzymatische Umsetzung von Benzaldehyd mit Acetoncyanhydrin (pH = 3,75; T = 20°C; c(BA) = 0,1 mM; c(ACN) = 3,5 mM)

Zwar wird in der Literatur (AK EFFENBERGER) sehr oft Acetoncyanhydrin als Cyanidquelle eingesetzt, aber im Unterschied zu dieser Arbeit wird dort in einem Zwei-Phasen-System (organische/wässrige Phase) gearbeitet.

Die Ursache, weshalb Benzaldehyd mit dem Acetoncyanhydrin nicht im wässrigen System reagiert, könnte folgender sein. Das Acetoncyanhydrin besitzt im Unterschied zur Blausäure einen unpolaren Molekülrest, so dass sich das weniger polare Acetoncyanhydrin schlechter in Wasser löst und schneller im dem Zwei-Phasen-System.

Unter den gewählten wässrigen Reaktionsbedingungen kommt also der Einsatz von Acetoncyanhydrin als Cyanidquelle nicht in Frage.

Im nächsten Versuch wurde Kaliumcyanid als Blausäurequelle für die enzymatische Reaktion getestet. Der Reaktionsverlauf wurde wieder über die Konzentrationsänderung des Benzaldehyds photometrisch verfolgt. Man erkennt in Abbildung 5-8, dass die Extinktion von Benzaldehyd innerhalb weniger Minuten stark abnimmt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 10 Minuten ist das Benzaldehyd fast vollständig umgesetzt.

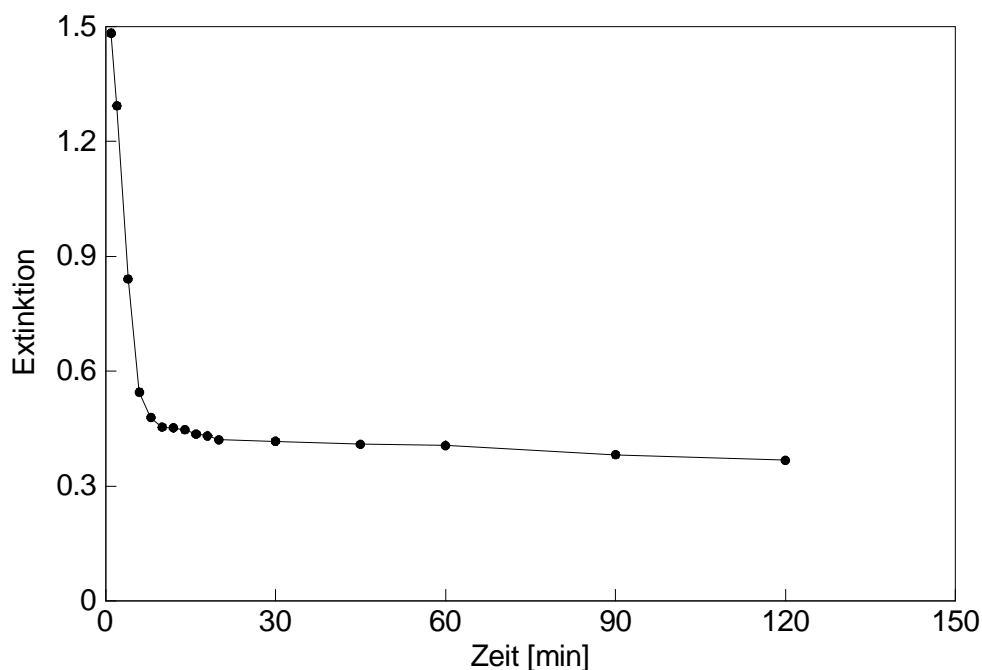


Abbildung 5-8: Enzymatische Umsetzung von Benzaldehyd mit Kaliumcyanid ( $\text{pH} = 3,75$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ ;  $c(\text{BA}) = 0,1 \text{ mM}$ ;  $c(\text{KCN}) = 3,5 \text{ mM}$ )

Da der Einsatz von Kaliumcyanid als Blausäurequelle zum Erfolg führte, wurden die folgenden Untersuchungen mit KCN durchgeführt.

### 5.3 Variation von Enzymquellen

Aufgrund des hohen Preises der (R)-Oxynitrilase sollte das Enzym von verschiedenen Anbietern bezogen und auf seine Aktivität getestet werden. Bei der Untersuchung des Reaktionsverlaufs der enzymatischen Cyanhydrinsynthese wurde die Konzentrationsabnahme des Benzaldehyds mittels Photometer und HPLC verfolgt. Dabei wurde festgestellt, dass sich die ermittelten Konzentrationen bei beiden Messverfahren nicht signifikant voneinander unterscheiden. Aufgrund des geringeren experimentellen Aufwandes und der Kosten (z.B. Laufmittel für HPLC usw.) erfolgte die Ermittlung der Enzymaktivitäten im Weiteren durch die photometrische Bestimmung der Benzaldehydkonzentration.

Um die in dieser Arbeit ermittelten Enzymaktivitäten mit denen der Hersteller vergleichen zu können, mussten die gleichen Testbedingungen wie bei den Anbietern ge-

wählt werden. Aus diesem Grund wurde anstelle der enzymatischen Cyanhydrinbildung die Rückreaktion, d.h. die Spaltung des Cyanhydrins betrachtet. Diese wird ebenfalls durch die (R)-Oxynitrilase katalysiert.

In Abbildung 5-9 sind die Extinktions-Zeit-Kurven der Cyanhydrinspaltung mit der (R)-Oxynitrilase unterschiedlicher Hersteller dargestellt.

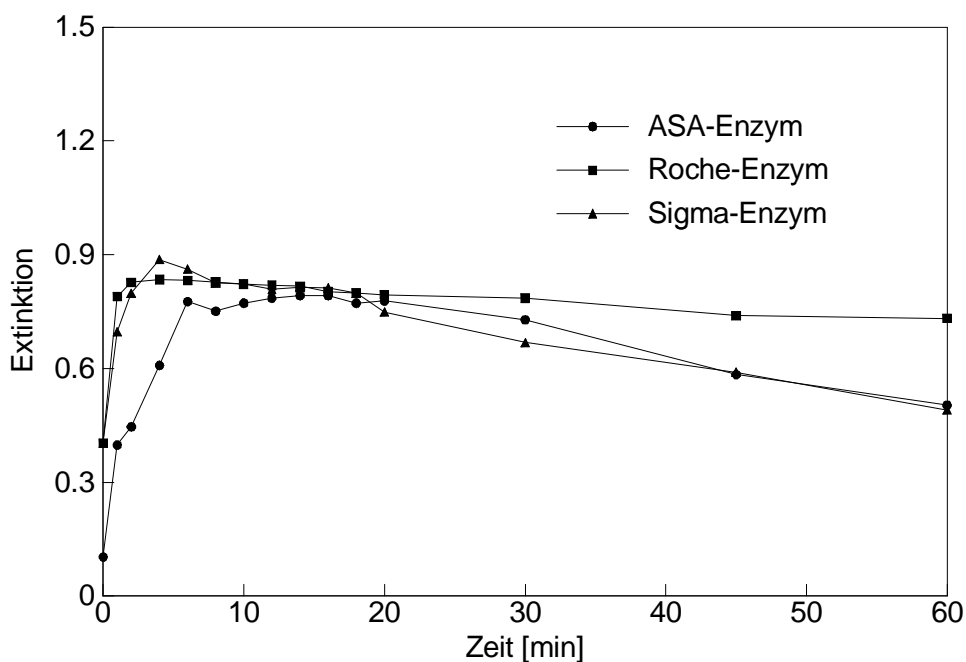


Abbildung 5-9: Unterschiedliche Enzymquellen (pH = 3,75; T = 30°C; c(MN) = 1 mM)

Die Reaktionsbedingungen, unter denen die Cyanhydrinspaltung erfolgte, waren wie folgt. Die Konzentration von Mandelonitril war 0,1 M und der pH-Wert war 3,75. Im Falle des ASA-Enzyms wurde die Cyanhydrinspaltung bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde die Reaktion mit dem ROCHE- bzw. SIGMA-Enzym bei 20°C durchgeführt. Bei jedem Ansatz wurde die gleiche Menge (0,36 mg) an Protein eingesetzt.

Aus Abbildung 5-9 geht hervor, dass alle drei Kurven einen Maximum durchlaufen. Am Anfang nimmt die Extinktion sehr stark zu, wobei die Steigung bei dem Enzym von der Firma ROCHE am größten ist. Die kleinste Steigung ist bei dem Enzym der Firma ASA zu beobachten. Nach dem das Maximum durchlaufen wurde, nimmt die Steigung der Kurve in allen drei Fällen ab. Da es sich bei dieser Reaktion um eine

Gleichgewichtsreaktion handelt, sollte im Idealfall aber der Kurvenverlauf hyperbolisch sein. Es ist zu klären, warum es zu solch einem Kurvenverlauf kommt. Es könnte sein, dass sich Benzaldehyd im Unterschied zu Mandelonitril bevorzugt an die aktiven Zentren anlagert und abreagiert. Um dies zu testen, wurde die Enzymmenge variiert. Für diese Versuchsreihe wurde das Enzym der Firma ASA eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 5-10 und Abbildung 5-11 aufgeführt.

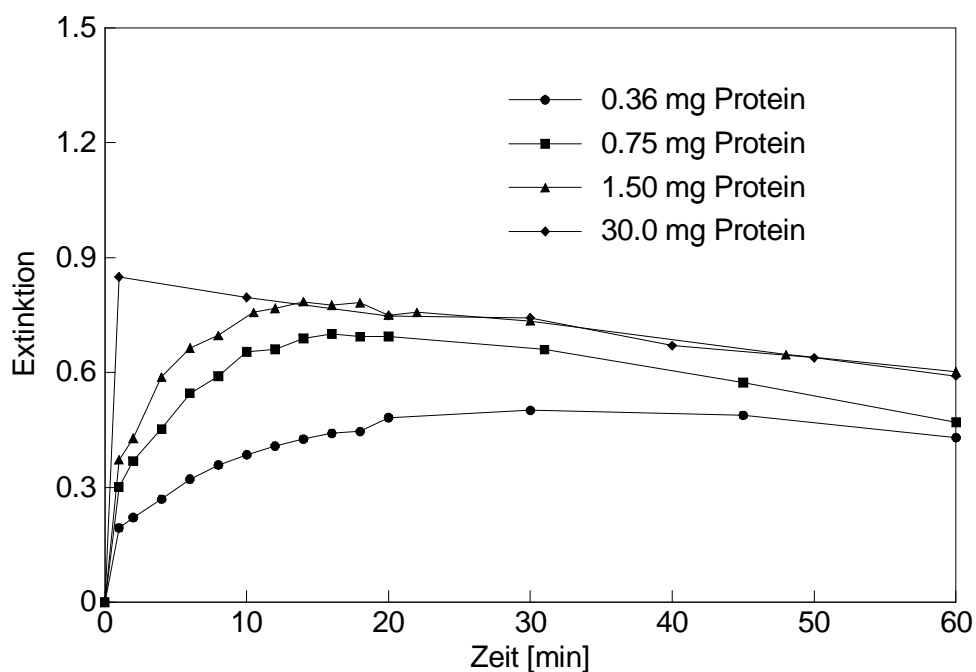


Abbildung 5-10: Variation der Enzymmenge (I) ( $\text{pH} = 3,75$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $c(\text{MN}) = 1 \text{ mM}$ )

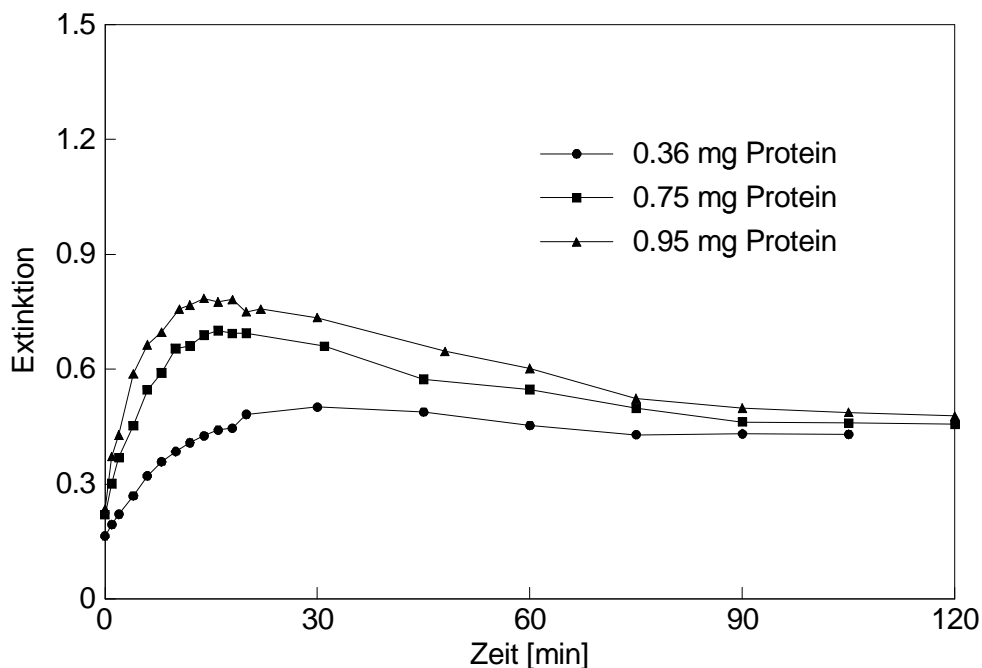


Abbildung 5-11: Variation der Enzymmenge (II) (pH = 3,75; T = 30°C; c(MN) = 1 mM)

Um zu klären, warum die Konzentration von Benzaldehyd wieder abnimmt, wurden folgende Versuche zur Untersuchung der Stabilität der Substrate durchgeführt:

- Umsatz von Benzaldehyd mit Enzym bei 20°C bzw. 30°C
- Umsatz von Benzaldehyd ohne Enzym bei 30°C
- Umsatz von Mandelonitril ohne Enzym bei 20°C bzw. 30°C

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 5-12 dargestellt. Aus Abbildung 5-12 geht hervor, dass beim Umsatz von Mandelonitril mit dem Enzym der Extinktionswert von Mandelonitril sowohl bei 20°C als auch bei 30°C konstant bleibt. Dagegen wird die Konzentration von Benzaldehyd in allen drei Fällen mit der Zeit kleiner. Bei dem Umsatz des Benzaldehyds mit dem Enzym bei 30°C ist die Konzentrationsabnahme am größten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass neben der enzymatischen Reaktion des Benzaldehyds zu Cyanhydrin noch eine weitere chemische Reaktion des Benzaldehyds vorliegt. Es könnte sich dabei um die Autoxidation des Benzaldehyds zur Benzoesäure handeln (Abbildung 5-13) [106]. Durch die Autoxidation des Benzaldehyd wird dieser aus dem System entfernt, wodurch sich das Gleichgewicht der enzymatischen Reaktion immer wieder neu einstellen muss.

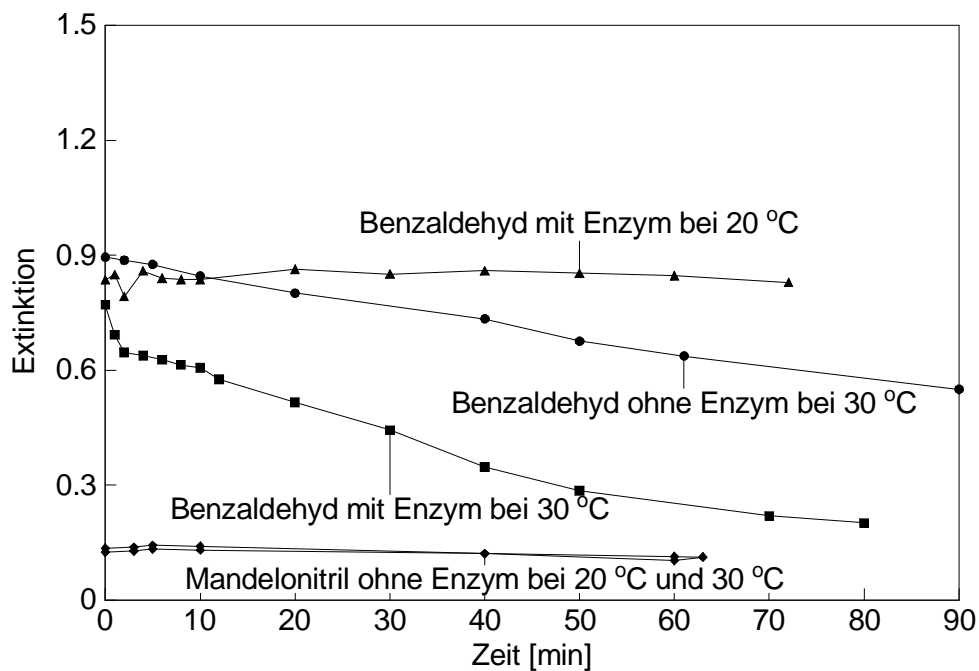


Abbildung 5-12: Untersuchungen zur Erklärung des nichthyperbolischen Kurvenverlaufs der enzymatischen Reaktion ( $\text{pH} = 3,75$ ;  $c(\text{BA}) = 0,1 \text{ mM}$ ;  $c(\text{MN}) = 1 \text{ mM}$ )

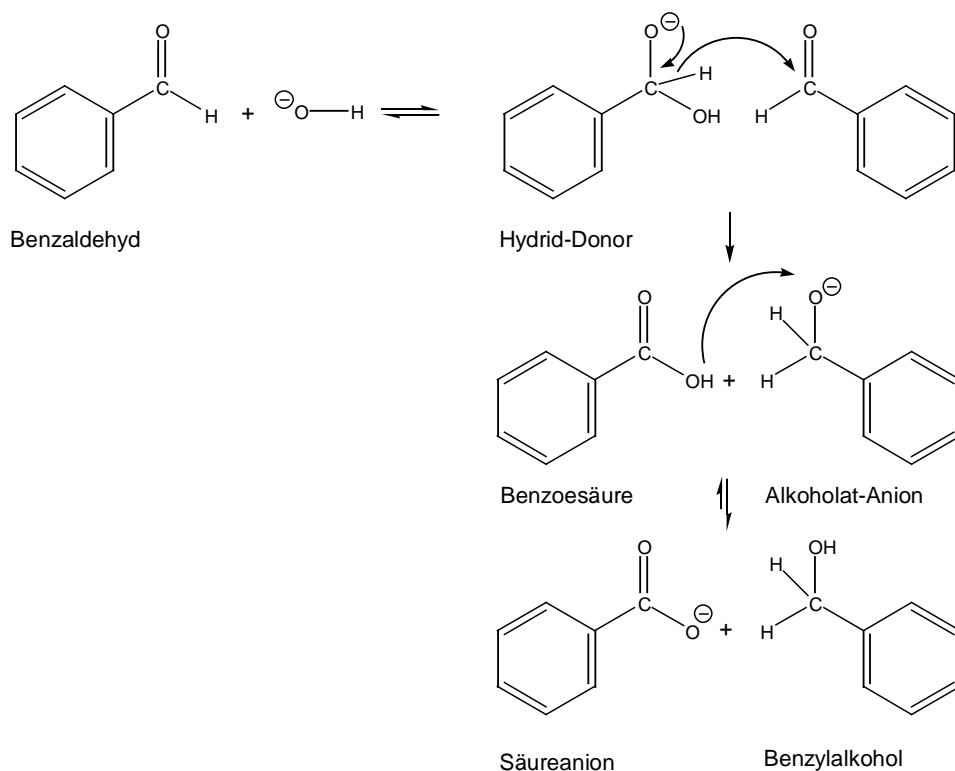


Abbildung 5-13: Autoxidation von Benzaldehyd

Aus den Extinktions-Zeit-Kurven der Abbildung 5-9 wurde über lineare Regression die Konzentrationen des Benzaldehyds bestimmt. Diese wurden wiederum gegen die Zeit aufgetragen und aus der Anfangssteigung die Aktivität der (R)-Oxynitrilase ermittelt. Die Enzymaktivitäten der verschiedenen Anbieter sind in Abbildung 5-14 einander gegenübergestellt.

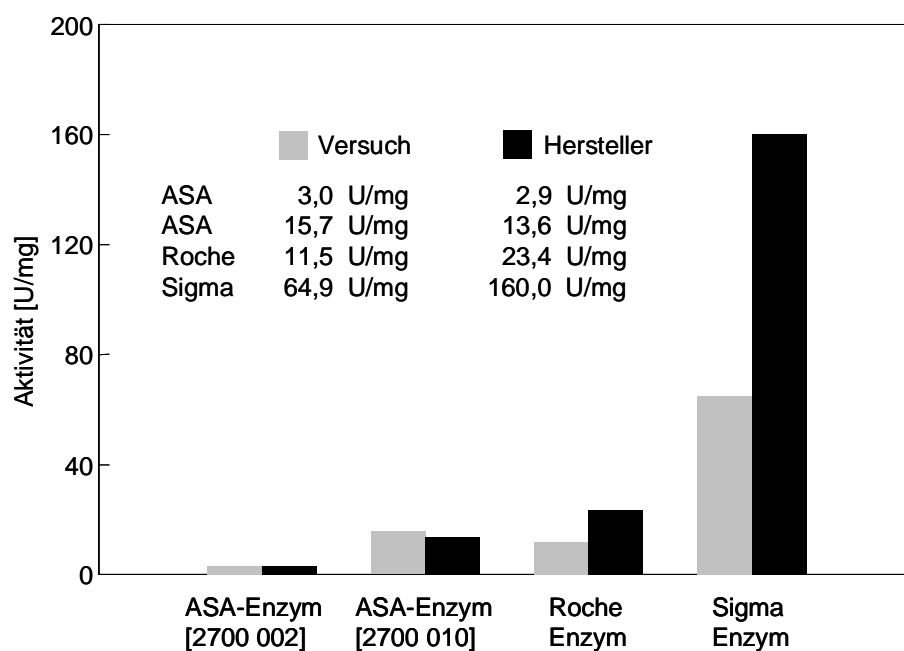


Abbildung 5-14: Enzymaktivität für die Enzyme von ROCHE, SIGMA- und ASA (pH = 3,75; c(BA) = 0,1 mM; c(KCN)=3,5; c(MN)=1 mM), T(ASA) = 30°C, T(ROCHE bzw. SIGMA) = 20°C; 1 U = 1 µmol/min

Die aus den Konzentrationsverläufen bestimmten Aktivitäten wurden mit denen der Hersteller verglichen. Bei der (R)-Oxynitrilase der Firma ASA stimmen die ermittelten Aktivitäten mit denen des Herstellers überein. Es wurden sogar teilweise höhere Aktivitäten gefunden. Im Gegensatz zu diesem Anbieter wiesen in den beiden anderen Fällen die Enzyme geringere Aktivitäten auf. Bei dem Enzym von ROCHE wich die Aktivität um ca. 50% von der des Herstellers ab. Im Falle des Enzyms von SIGMA war die Aktivität sogar um 60 % kleiner.

Die Reinheit der eingesetzten Enzyme wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) überprüft. Bei der SDS-Page handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Auf-

trennung erfolgt dabei durch die mit abnehmender Molekülgröße zunehmende Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und Disulfidbrücken (S-S) reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert.

Durch die Bindung von SDS an das denaturierte Protein wird der Einfluss der proteineigenen Ladung überdeckt, so dass beim Anlegen eines elektrischen Feldes die Wanderungsgeschwindigkeit nur von der Molekülgröße abhängt.

In Abbildung 5-15 werden beispielsweise die Reinheit des Enzyms von ASA und des von SIGMA miteinander verglichen.

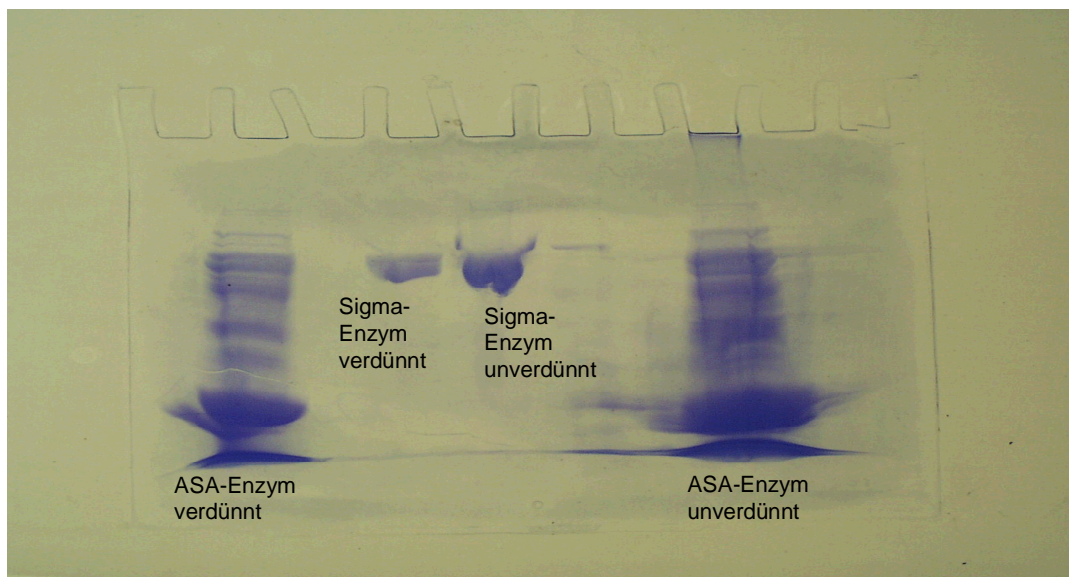


Abbildung 5-15: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Hierbei wird deutlich, dass das Enzym der Firma SIGMA sehr rein ist, da man nur eine einzige Bande sieht. Bei dem Enzym von ASA hingegen sind mehrere Banden zu sehen, was für eine Verunreinigung des Enzyms mit anderen Proteinen spricht.

Bei der Gelelektrophorese des Enzyms der Firma ROCHE, welches in Abbildung 5-15 nicht aufgeführt ist, wurde ebenfalls nur eine einzige Bande beobachtet. Sowohl das Enzym der Firma SIGMA als auch das Enzym der Firma ROCHE sind im Vergleich zum Enzym von ASA hoch rein.



Hinsichtlich der Aktivität und des Preisfaktors erwies sich aber das Enzym der Firma ASA in der Summe seiner Eigenschaften als am besten geeignet. Daher wurden die kinetischen und Immobilisierungsversuche mit diesem Enzym durchgeführt.

## **5.4 Kinetische Untersuchung der enzymatischen Cyanhydrin-synthese**

Für den industriellen Einsatz ist die Kinetik der freien und immobilisierten Enzymen von großem Interesse. Jedes Enzym hat eine andere spezifische Aktivität (Geschwindigkeit), mit der es bestimmte Substrate umsetzt. Diese Aktivität kann auf verschiedene Art und Weise beeinflusst werden. Am einfachsten kann die Gesamtaktivität in einem Reaktionsprozess über die Menge an Enzym geregelt werden. Technisch interessant ist auch die Regelung der Aktivität über die Temperatur und den pH-Wert. Mit steigender Temperatur durchläuft die Enzymaktivität ein Maximum, wobei oftmals die Selektivität abnimmt. Dieses Maximum entsteht, da zuerst die Aktivität mit der Temperatur zunimmt, die Proteindenaturierung ab einer kritischen Temperatur aber so stark ist, dass die Aktivität insgesamt drastisch abnimmt. Ein ähnliches Optimum existiert auch bei der pH-Abhängigkeit (siehe Kapitel 1.1.1 und 1.1.2). Auch dies ist verständlich, wenn man den Einfluss des pH-Werts auf die Proteinkonfiguration bedenkt (Protonierung/Deprotonierung verschiedenster Gruppen). Einer der Hauptfaktoren, der die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion definiert, ist die Substratkonzentration.

### **5.4.1 Einfluss der Substratkonzentration**

Grundlage für die Beschreibung der kinetischen Parameter der enzymatischen Reaktion ist die Michaelis-Menten-Gleichung.

Bei der Michaelis-Menten-Gleichung wird angenommen, dass die Reaktion irreversibel verläuft. Wenn die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion gegen die Substratkonzentration aufgetragen wird, entsteht die typische Michaelis-Menten-Kurve.

Für die Abschätzung der MICHAELIS-MENTEN-Parameter ( $K_m$  und  $V_{max}$ ) stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

**Möglichkeit 1:** Messung der zeitabhängigen Konzentrationen des Substrats  $c_s(t)$  und des Produkts  $c_p(t)$ , Integration der Michaelis-Menten-Kinetik, Optimieren der kinetischen Parameter durch Minimierung des Fehlerquadrates:

$$\min_{K_m, V_{\max}} \Phi = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{c_{s, \text{gem}}(t_i) - c_{s, \text{ber}}(t_i)}{c_{s, \text{ber}}(t_i)} \right]$$

$c_{s, \text{gem}}$ : gemessene Substratkonzentration  
 $c_{s, \text{ber}}$ : berechnete Substratkonzentration  
 $t$ : Reaktionszeit

Die Integration der Michaelis-Menten-Kinetik erfolgt entweder numerisch oder führt zur analytischen Lösung.

**Möglichkeit 2:** Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten  $V(t > 0)$  bei unterschiedlichen Anfangssubstratkonzentrationen,  $c_s(t = 0)$ . Die Änderung der Substratkonzentration in dem entsprechenden Zeitabschnitt  $\Delta t$  wird dabei vernachlässigt.

Zur Auswertung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit wird der zweite Weg eingeschlagen.

Aus der MICHAELIS-MENTEN-Kurve ist es meist schwierig,  $V_{\max}$  und  $K_m$  direkt zu bestimmen. In der Literatur werden deshalb oft graphische Linearisierungsmethoden verwendet (Tabelle 3). Alternativ kann die Bestimmung der Parameter  $K_M$  und  $V_{\max}$  aus den Anfangsgeschwindigkeiten mit Hilfe einer nichtlinearen Regression am Computer geschehen (Simulation). Hierfür gibt es heutzutage viele Softwarepakete, wie zum Beispiel: Sigmaplot, Mathlab oder Origin. In dieser Arbeit wird das letztgenannte Programm eingesetzt.

#### 5.4.1.1 Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung auf Zwei-Substrat-Reaktionen

Bei der hier untersuchten enzymatischen Cyanhydrinsynthese sind zur Reaktionsführung zwei Substrate (Aldehyd und Blausäure) nötig. Um die Michaelis-Menten-Gleichung für eine Zwei-Substrat-Reaktion verwenden zu können, wird ein Substrat in Sättigungskonzentration vorgelegt, so dass  $[S_x] \gg K_{M, S_x}$ . Dadurch wird ein Term

der Michaelis-Menten-Gleichung ungefähr "Eins" und kann deshalb aus der Gleichung eliminiert werden. Eine scheinbar einfache MICHAELIS-MENTEN-Kinetik ist dann gegeben.

Zu erwähnen ist, dass die Vereinfachung der Michaelis-Menten-Gleichung für Mehr-Substrat-Reaktionen keinerlei Auskunft über den Mechanismus dieser enzymkatalysierten Reaktionen gibt. Die Reaktion wird nur formalkinetisch beschrieben. Der wesentliche Vorteil ist die anschauliche Beschreibung und einfache Bestimmung der kinetischen Parameter. Die Genauigkeit der Michaelis-Menten-Konstanten ist für technische Prozesse ausreichend.

Die experimentelle Bestimmung der kinetischen Konstanten der enzymatischen Cyanhydrinsynthese erfordert zahlreiche Messreihen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Diese werden über einen weiten Bereich bei ansonsten konstanten Reaktionsbedingungen variiert, um daraus die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu ermitteln [68].

Der Mechanismus der enzymatischen Cyanhydrinsynthese wird untersucht, indem bei konstanter Benzaldehydkonzentration die Kaliumcyanidkonzentration variiert wird. In einer zweiten Versuchsreihe wird dagegen die Konzentration des Benzaldehyds verändert.

Für diese Versuche werden geringere Mengen an Enzym eingesetzt, um in der langsameren Reaktion den Umsatzzuwachs zu Reaktionsbeginn mit mehreren Proben erfassen zu können. Dadurch ergibt sich eine höhere Genauigkeit bei der Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, da für die Ermittlung der kinetischen Parameter die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt wird.

### 5.4.1.2 Variation der Kaliumcyanidkonzentration

Zur Ermittlung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Kaliumcyanidkonzentration wird diese variiert (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die Benzaldehydanfangskonzentration beträgt in Tabelle 1 0,1 mM und in Tabelle 2 1 mM.

Tabelle 1: Variation der Kaliumcyanidkonzentration bei einer Benzaldehydanfangskonzentration von 0,1 mM

$c_0(\text{BA})$ [mM]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$c_0(\text{KCN})$ [mM]	3,8	7,8	15,4	30,7	38,4	46,1	57,6	76,8

Tabelle 2: Variation der Kaliumcyanidkonzentration bei einer Benzaldehydanfangskonzentration von 1 mM

$c_0(\text{BA})$ [mM]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$c_0(\text{KCN})$ [mM]	3,8	7,8	15,4	19,2	23,0	30,7	38,4	46,1	57,6	76,8	153,6

Die Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17 zeigen die Konzentrations-Zeit-Kurven für den Reaktionsverlauf der Cyanhydrinsynthese. In Abbildung 5-16 sind die Ergebnisse der Tabelle 1 und in Abbildung 5-17 die Ergebnisse der Tabelle 2 graphisch dargestellt. In Abbildung 5-16 ist die Konzentration in  $\mu\text{M}$  über die Zeit in Minuten aufgetragen. Wogegen in Abbildung 5-17 die Konzentration in mM über die Zeit in Minuten aufgetragen ist.

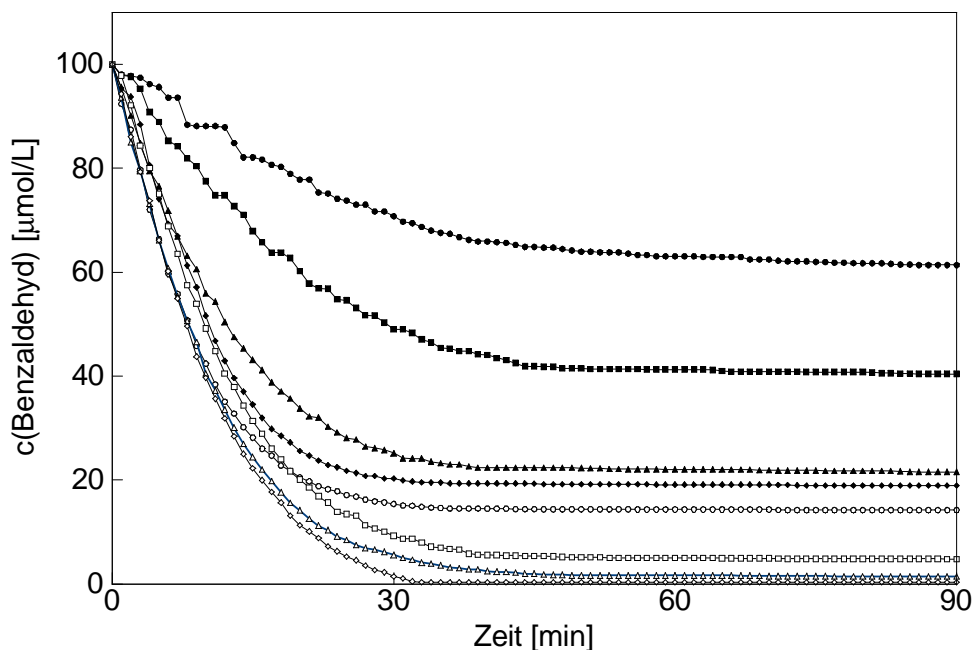


Abbildung 5-16: Konzentrations-Zeit-Kurven bei Variation von Kaliumcyanid

(pH = 3,75; T = 20°C;  $c_0(\text{BA}) = 0,1 \text{ mM}$ ;  $c_0(\text{KCN}) = 3,8 \text{ mM}$ ; 7,8 mM; 15,4 mM; 30,7 mM; 38,4 mM; 46,1 mM; 57,6 mM; 76,8 mM; Kurvenverlauf von oben nach unten)

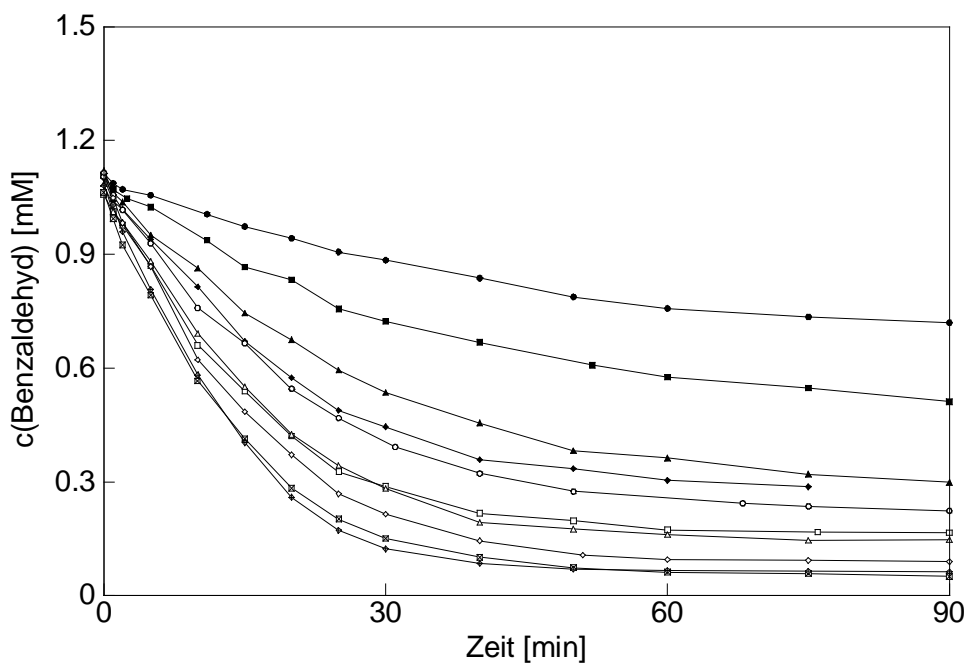


Abbildung 5-17: Konzentrations-Zeit-Kurven bei Variation von Kaliumcyanid

(pH = 3,75; T = 20°C;  $c_0(\text{BA}) = 1 \text{ mM}$ ;  $c_0(\text{KCN}) = 3,8 \text{ mM}$ ; 7,8 mM; 15,4 mM; 19,2 mM; 23,0 mM; 30,7 mM; 38,4 mM; 46,1 mM; 57,6 mM; 76,8 mM; 153,6 mM Kurvenverlauf von oben nach unten)

Aus Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17 geht hervor, dass mit steigender Kaliumcyanidkonzentration auch der Umsatz zunimmt. Gleichzeitig wird die negative Steigung der Kurve und damit die Enzymaktivität größer.

Die Enzymaktivität wird durch die Aufnahme einer Konzentrations-Zeit-Kurve bestimmt. Aus der Anfangssteigung der Konzentrations-Zeit-Kurve aus Abbildung 5-16 wird die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Die mittels dieser Methode bestimmten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten sind in Abbildung 5-18 dargestellt. Hierbei wurden sie gegen die Kaliumcyanidkonzentration aufgetragen.

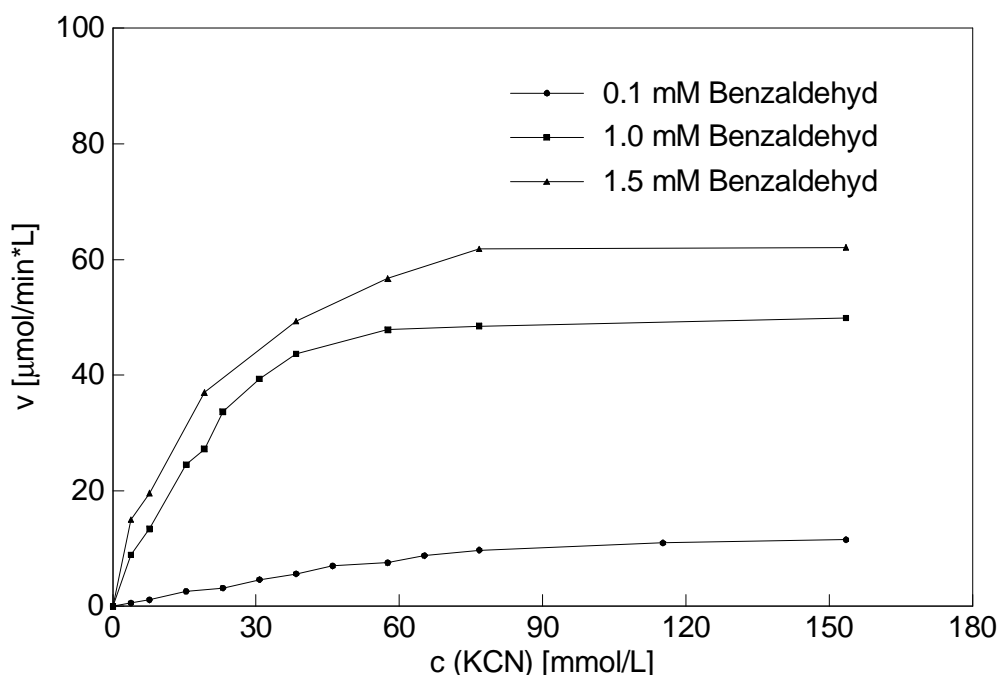


Abbildung 5-18: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Kaliumcyanidkonzentration

Die Auftragung der Substratkonzentration über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten führt in diesem Fall zur hyperbolischen Enzymkennlinie. Im Bereich niedriger Kaliumcyanidkonzentration ( $c(\text{KCN}) = 30 \text{ mM}$ ) ist die Abhängigkeit nahezu linear. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit langsamer zu und nähert sich schließlich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, an. Die Ursache für die Reaktionsgeschwindigkeitsbegrenzung ist u.a. die Menge des Enzyms. Da dieses bei der Reaktion intermediär eine Bindung mit dem Substrat eingeht, kommt es schließlich zu einer Absättigung, so dass eine weitere Erhöhung der Kaliumcyanid-

konzentration keinen Einfluss mehr besitzt. Ab einer Kaliumcyanidkonzentration von 76,8 mM liegt das Substrat KCN im Überschuss vor.

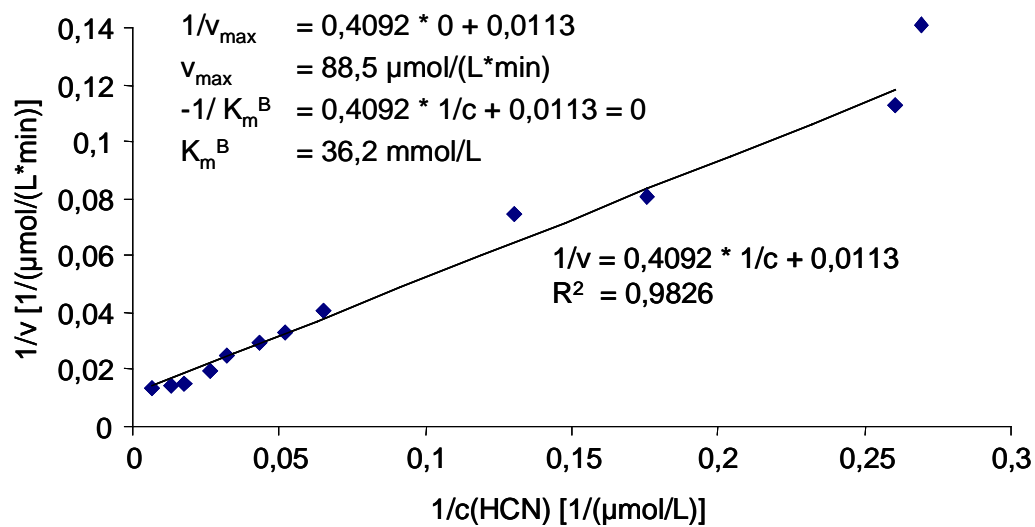
Da sich bei der Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit über die Kaliumcyanidkonzentration eine Hyperbel ergibt, lässt sich daraus schlussfolgern, dass durch Erhöhung der Kaliumcyanidkonzentration keine Substrathemmung auftritt.

Aus dem Kurvenverlauf können die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  nicht exakt ermittelt werden. Zur besseren Bestimmung der kinetischen Parameter ist es vorteilhafter die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung so umzuformen, dass man einen linearen Zusammenhang erhält. Hierfür werden in der Literatur unterschiedliche Linearisierungsmethoden verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Linearisierungsmethoden der Michaelis-Menten-Gleichung [68]

Transformation	LINEWEAVER-BURK	HANES	EADIE-HOFSTEE
Abszisse	$1/[S]$	$[S]$	$V/[S]$
Ordinate	$1/V$	$[S]/V$	$V$
Steigung	$K_m/v_{max}$	$1/v_{max}$	$-K_m$
Abszissen-schnittpunkt	$-1/K_m$	$-K_m$	$V_{max}/K_m$
Ordinaten-schnittpunkt	$1/V_{max}$	$K_m/v_{max}$	$V_{max}$

Die doppelt reziproke Auftragungsmethode nach LINEWEAVER-BURK ist die am weitesten verbreitete Methode, mit der man durch Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit die MICHAELIS-MENTEN-Konstante bestimmt.



In

Abbildung 5-19 ist die Hyperbel nach LINEWEAVER-BURK ( $1/V$  über  $1/c$ ) linearisiert. Betrachtet wird der Kurvenverlauf für die Benzaldehydkonzentration von 1 mM. Aus der erhaltenen linearen Funktion werden dann  $K_m$  und  $V_{\max}$  graphisch ermittelt.

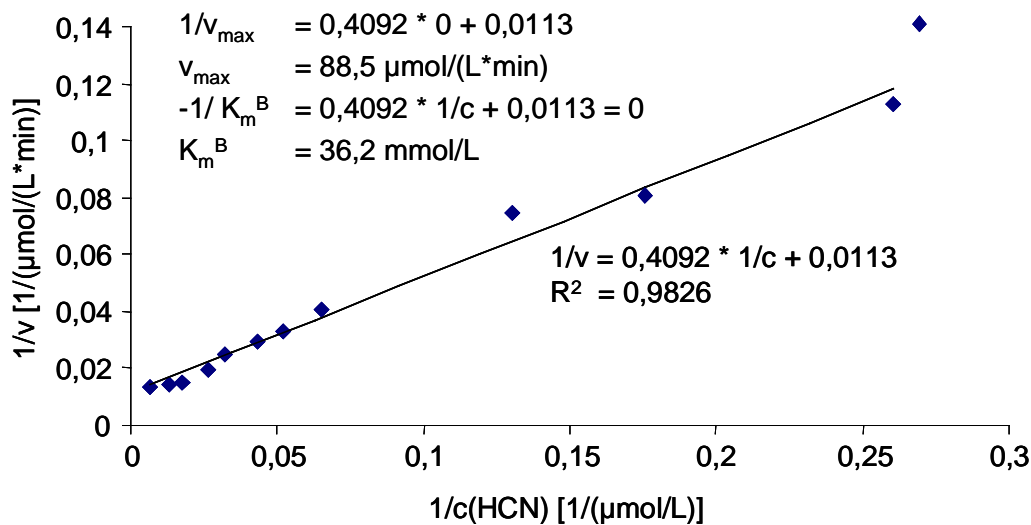


Abbildung 5-19: Lineweaver-Burk-Diagramm: Auftragung der reziproken Anfangsgeschwindigkeit gegen die reziproke Kaliumcyanidkonzentration

Bei der Auftragung von  $1/V$  gegen  $1/c$  erhält man eine Gerade mit dem Anstieg  $K_m/V_{\max}$  und dem Ordinatenabschnitt  $1/V_{\max}$ . Bei der Cyanhydrinsynthese ergeben sich damit für das Substrat KCN für  $V_{\max} = 88,5 \mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{min}$  und für  $K_{mB} = 36,2 \text{ mM}$ .



#### 5.4.1.3 Variation der Benzaldehydkonzentration

Im zweiten Schritt wird der Einfluss von Benzaldehyd auf die Cyanhydrinsynthese untersucht. Hierbei wird die Benzaldehydkonzentration bei konstanter Kaliumcyanidkonzentration variiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5-20 zusammen gestellt.

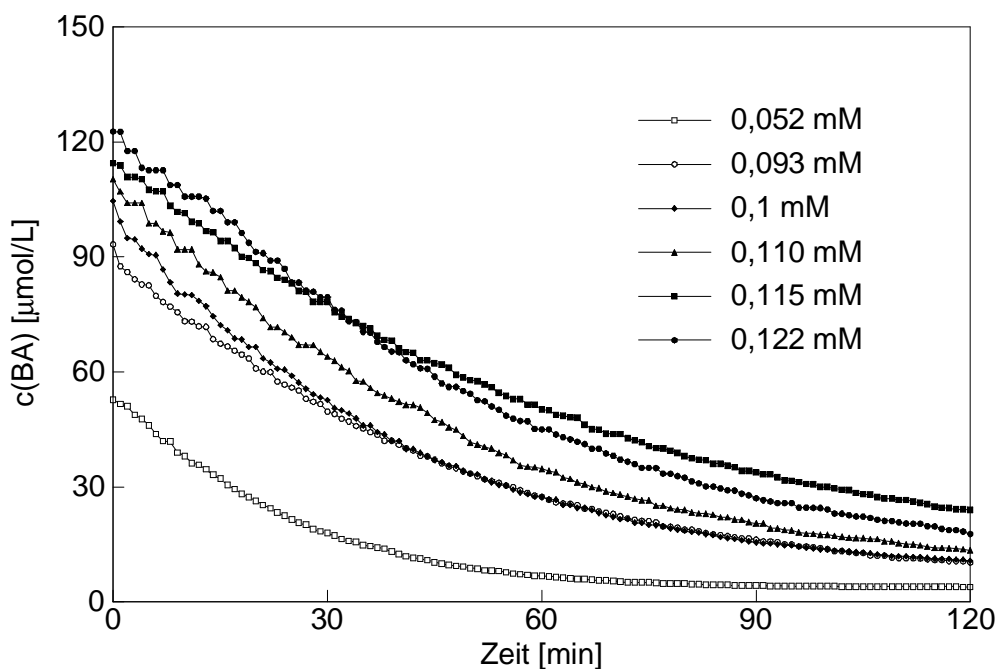


Abbildung 5-20: Konzentrations-Zeit-Kurve bei Variation von Benzaldehyd (pH = 3,75; T = 20°C; c(KCN) = 76,8 mM; c(BA) = 0,052 mM; 0,093 mM; 0,1 mM; 0,11 mM; 0,115 mM; 0,122 mM)

Die Abbildung 5-20 zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurven für den Reaktionsverlauf der Cyanhydrinsynthese bei Variation der Benzaldehydkonzentration. Im Unterschied zur Konzentrations-Zeit-Kurve von Kaliumcyanid erhält man hier eine fast lineare Abhängigkeit der Aldehydkonzentration von der Zeit. Betrachtet man im Unterschied zur Konzentrations-Zeit-Kurve von Kaliumcyanid den linearen Anfangsbereich der Enzymreaktion, so sieht man, dass die negative Steigung der Kurven in allen Fällen fast gleich groß ist. Dieser Zustand kommt daher, dass Kaliumcyanid im Überschuss vorhanden ist, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit in allen Fällen konstant bleibt.

Der Einfluss von Benzaldehyd auf die Cyanhydrinsynthese wurde auch für weitere Kaliumcyanidkonzentration untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5-21 zusammengestellt.

Auch in diesem Fall wurde aus den Konzentrations-Zeit-Kurven der Abbildung 5-20 die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Cyanhydrinsynthese ermittelt und diese gegen die Benzaldehydkonzentration aufgetragen (Abbildung 5-22).

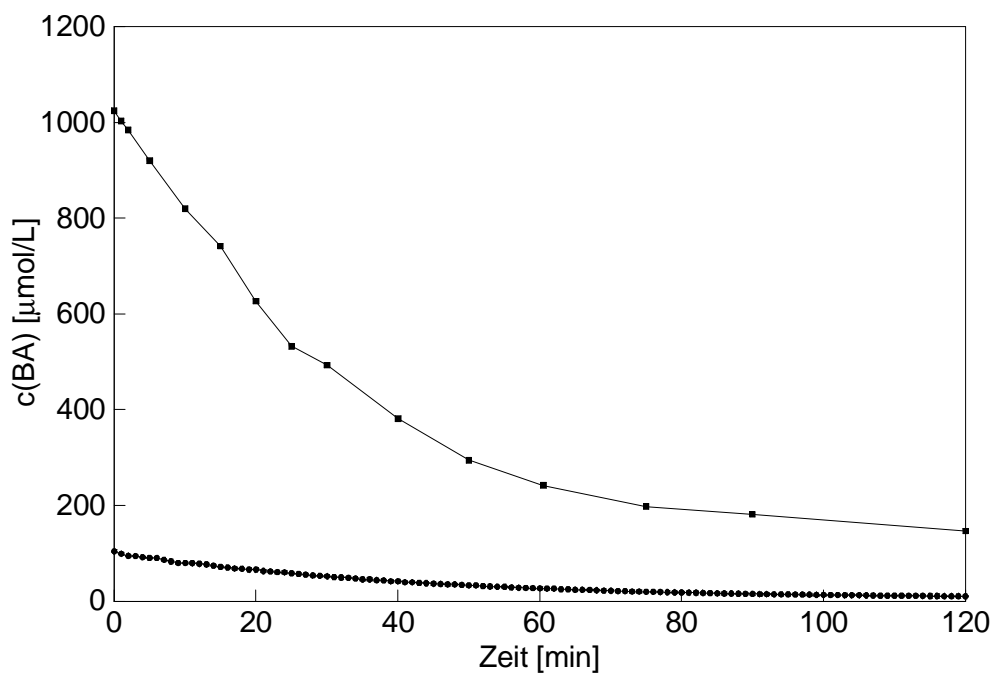


Abbildung 5-21: Konzentrations-Zeit-Kurve bei Variation der Benzaldehydkonzentration  
(pH = 3,75; T = 20°C; c(KCN) = 76,8 mM; c(BA) = 0,1 mM; 1,0 mM)

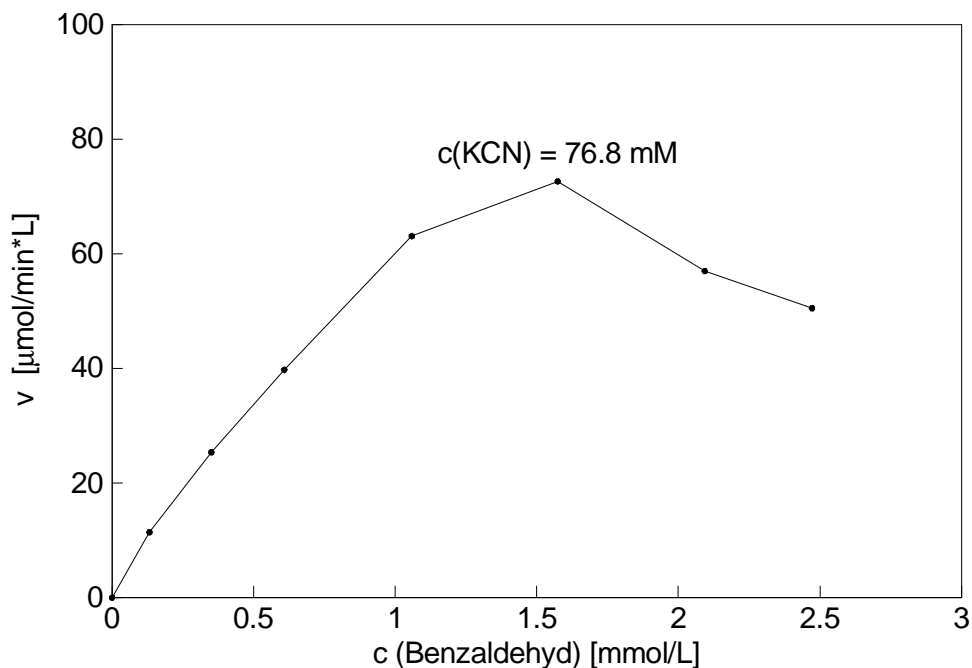


Abbildung 5-22: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Benzaldehydkonzentration  
(pH = 3,75; T = 20°C;  $c(\text{KCN}) = 76,8 \text{ mM}$ )

Die Kurve verläuft bei kleinen Substratkonzentrationen ( $c(\text{BA}) \leq 1 \text{ mM}$ ) linear, durchläuft aber bei hohen Substratkonzentration ein Maximum. Da Kaliumcyanid im Überschuss eingesetzt wird, ist immer genügend KCN-Substrat für die Enzymreaktion vorhanden. Der nichthyperbolische Verlauf der Enzymkennlinie kann also nur durch die Benzaldehydkonzentration hervorgerufen worden sein. Der Aldehyd wirkt sich ab einer bestimmten Konzentration hemmend auf die enzymatische Reaktion aus. Es ist möglich, dass Benzaldehyd, wenn seine Konzentration zu hoch wird, die aktiven Zentren der (R)-Oxynitrilase für das Kaliumcyanid blockiert. Seine Affinität für die aktiven Zentren für Benzaldehyd muss viel höher als die von KCN sein.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter musste die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung nach Lineweaver-Burk umgeformt werden. Die Auswertung nach LINEWEAVER-BURK ergibt für die reziproke Geschwindigkeit über die reziproke Benzaldehydkonzentration ( $c(\text{KCN}) 76,8 \text{ mM}$ ) die Abbildung 5-23.

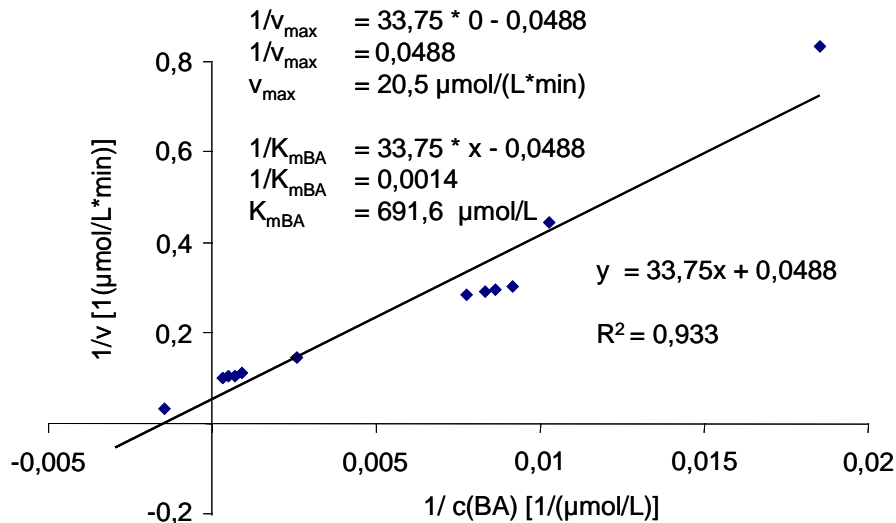


Abbildung 5-23: Lineweaver-Burk-Diagramm: Auftragung der reziproken Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Benzaldehydkonzentration

Man erkennt im LINEWEAVER-BURK-Diagramm eine lineare Abhängigkeit der reziproken Geschwindigkeit von der reziproken Benzaldehydkonzentration. Aus dem Anstieg der Kurve und dem Schnittpunkt mit der Ordinate werden die Parameter  $K_{\text{m}}^{\text{BA}}$  (691,6  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) und  $V_{\text{max}}$  (20,5  $\mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{min}$ ) bestimmt.

#### 5.4.2 Einfluss der Produktkonzentration

Es muss untersucht werden, ob die (R)-Oxynitrilase durch das Produkt Mandelonitril inhibiert wird. Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten kann ebenfalls durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion unter Standardbedingungen erfolgen, wobei das Reaktionsprodukt Mandelonitril vor dem Start der Reaktion in bestimmter Konzentration zugegeben wird. Die Reaktion wird mit Zugabe des Benzaldehyds gestartet.

In Abbildung 5-24 ist die Konzentration von Benzaldehyd gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

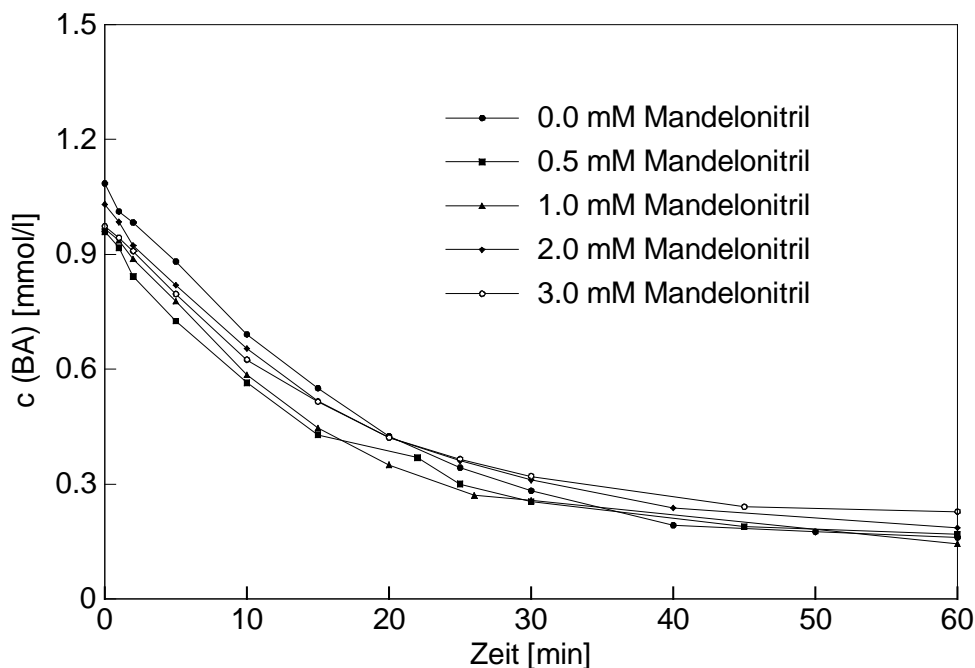


Abbildung 5-24: Variation von Mandelonitrilkonzentration (MN) ( $\text{pH} = 3,75$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ ;  $c(\text{KCN}) = 76,8$  mM;  $c(\text{MN}) = 0,1$  mM; 1,0 mM, 2 mM, 3 mM)

Aus Abbildung 5-24 geht hervor, dass alle Kurven sehr eng beieinander liegen. Die Steigung der Kurven ist in allen Fällen gleich, d.h. dass die Konzentration des Mandelonitrils keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Damit ist gezeigt, dass es bei einer Zugabe von bis zu 3 mM Mandelonitril zu keiner Produkt-hemmung kommt. Mandelonitril blockiert im Unterschied zu Benzaldehyd die aktiven Zentren der (R)-Oxynitrilase nicht.

#### 5.4.3 Mechanismus der enzymatischen Cyanhydrinsynthese

Bei der experimentellen Untersuchung ergab sich, dass die beiden Substrate Kaliumcyanid und Benzaldehyd zum Cyanhydrin reagieren. In Bezug auf Benzaldehyd wurde eine konzentrationsabhängige Substrathemmung festgestellt. Kaliumcyanid und Mandelonitril wirken sich nicht hemmend auf die Reaktion aus.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Anlagerung der Substrate an das Enzym (R)-Oxynitrilase rein zufällig erfolgt.

Es wird deshalb angenommen, dass die enzymatische Cyanhydrinsynthese nach einem Random-Bi-Uni-Mechanismus abläuft.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit des Random-Bi-Uni-Mechanismus wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$v = -\frac{dA}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot BA \cdot B}{K_i^{BA} \cdot K_m^B + K_m^B \cdot BA + K_m^{BA} \cdot B + BA \cdot B} \quad \text{Gleichung 1}$$

v:	Reaktionsgeschwindigkeit
$V_{\max}$ :	max. Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese
$BA = A$ :	Konzentration des Benzaldehyd [mol/L]
B:	Konzentration der Blausäure [mol/L]
$K_i^A$ :	Inhibierungskonstante für Benzaldehyd [mol/L])
$K_m^A$ :	MICHAELIS-MENTEN-Konstante für Benzaldehyd [mol/L]
$K_m^B$ :	MICHAELIS-MENTEN-Konstante für die Blausäure [mol/L]
t:	Reaktionszeit

Die Gleichung (1) wird wie folgt umgeformt:

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B + K_m^B \cdot A + K_m^A \cdot B + A \cdot B}{A \cdot B} \right] \cdot dA = -v_{\max} \cdot dt \quad \text{Gleichung 2}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{A \cdot B} + \frac{K_m^B \cdot A}{A \cdot B} + \frac{K_m^A \cdot B}{A \cdot B} + \frac{A \cdot B}{A \cdot B} \right] \cdot dA = -v_{\max} \cdot dt \quad \text{Gleichung 3}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{A \cdot B} + \frac{K_m^B}{B} + \frac{K_m^A}{A} + 1 \right] \cdot dA = -v_{\max} \cdot dt \quad \text{Gleichung 4}$$

$$\frac{K_i^A \cdot K_m^B}{A \cdot B} dA + \frac{K_m^B}{B} dA + \frac{K_m^A}{A} dA + dA = -v_{\max} \cdot dt \quad \text{Gleichung 5}$$

$$\frac{1}{A} \cdot \left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] dA + \frac{K_m^B}{B} dA + dA = -v_{\max} \cdot dt \quad \text{Gleichung 6}$$

Im nächsten Schritt wird diese Gleichung integriert:

$$\frac{1}{A} \cdot \left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] dA + \frac{K_m^B}{B} dA + dA = -v_{\max} \cdot dt \quad \text{Gleichung 7}$$

$$\int \frac{1}{A} \cdot \left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] dA + \int \frac{K_m^B}{B} dA + \int dA = -v_{\max} \int dt \quad \text{Gleichung 8}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] \int \frac{1}{A} dA + \frac{K_m^B}{B} \int dA + \int dA = -v_{\max} \int dt \quad \text{Gleichung 9}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] \cdot \ln A \Big|_{A_0}^A + \frac{K_m^B}{B} A \Big|_{A_0}^A + A \Big|_{A_0}^A = -v_{\max} \cdot t \Big|_0^t \quad \text{Gleichung 10}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] \cdot (\ln A - \ln A_0) + \frac{K_m^B}{B} (A - A_0) + (A - A_0) = -v_{\max} \cdot t \quad \text{Gleichung 11}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] \cdot (\ln A_0 - \ln A) - \frac{K_m^B}{B} (A - A_0) - (A - A_0) = v_{\max} \cdot t \quad \text{Gleichung 12}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] \cdot \ln \frac{A_0}{A} - \frac{K_m^B}{B} (A - A_0) - (A - A_0) = v_{\max} \cdot t \quad \text{Gleichung 13}$$

$$\left[ \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right] \cdot \ln \frac{A_0}{A} - (A - A_0) \left[ \frac{K_m^B}{B} + 1 \right] = v_{\max} \cdot t \quad \text{Gleichung 14}$$

Die Umformung der Gleichung (14) nach der Zeit ergibt:

$$t = \frac{1}{v_{\max}} \left[ \left( \frac{K_i^A \cdot K_m^B}{B} + K_m^A \right) \cdot \ln \frac{A_0}{A} - (A - A_0) \left( \frac{K_m^B}{B} + 1 \right) \right] \quad \text{Gleichung 15}$$

In diese Gleichung werden die experimentell bestimmten Parameter  $K_m^A$ ,  $K_m^B$ ,  $K_i^A$  und  $v_{\max}$  eingesetzt. Die Berechnung erfolgt mit dem Programm Origin (Abbildung 5-25).

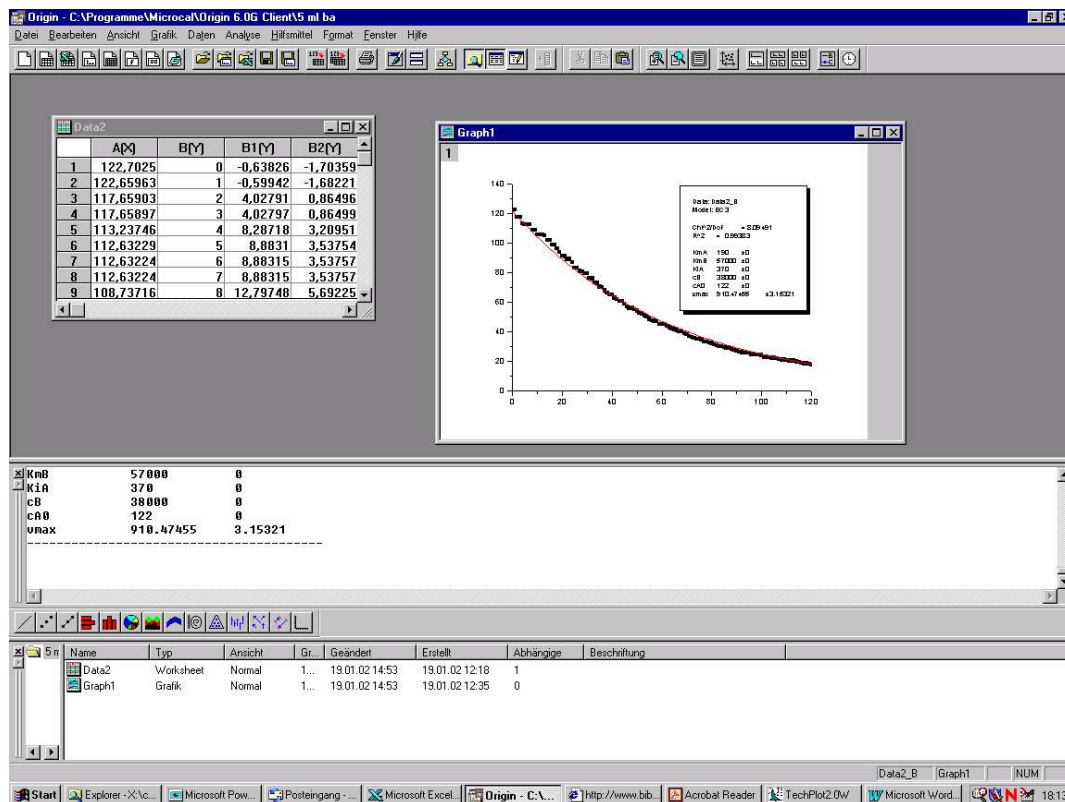


Abbildung 5-25: Origin-Software

In Abbildung 5-26 wird die experimentell bestimmte Kurve mit der simulierten Kurve verglichen. Um die Kurvenverläufe besser mit einander vergleichen zu können, wird ein kleinerer Abschnitt der Abbildung 5-26 in Abbildung 5-27 dargestellt.



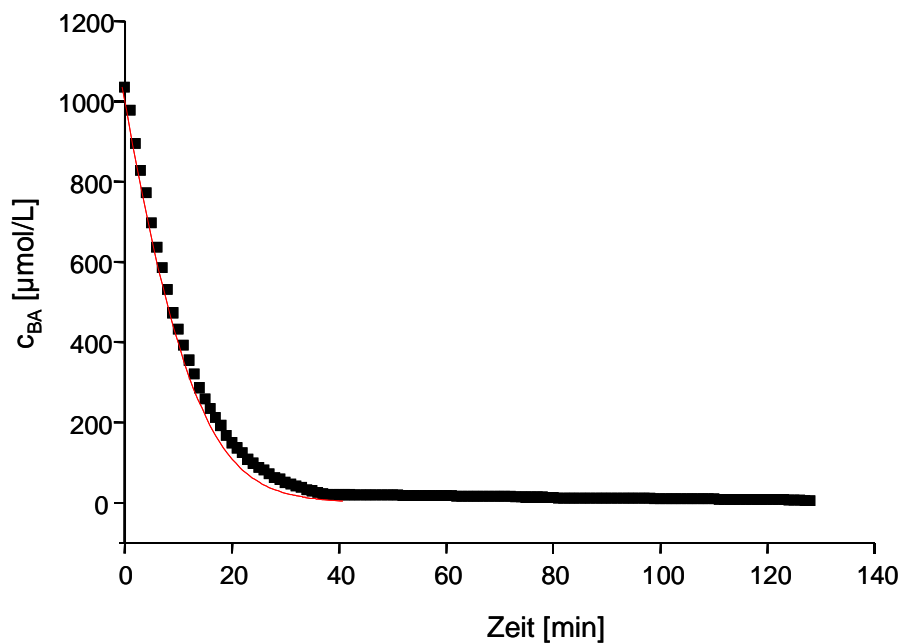


Abbildung 5-26: Vergleich experimentell bestimmte Kurve mit der simulierten Kurve

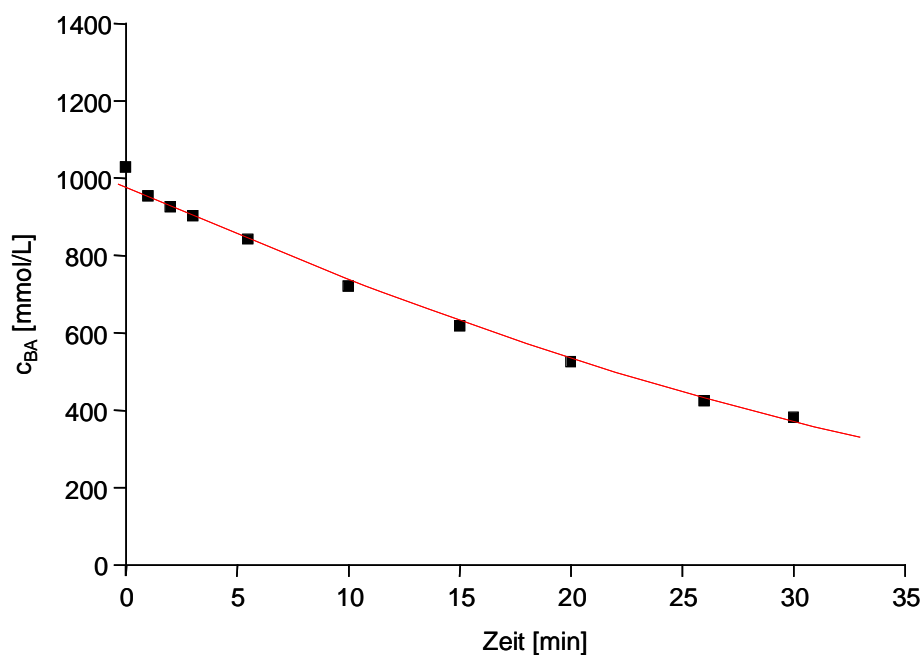


Abbildung 5-27: Vergleich der experimentell bestimmte Kurve mit der simulierten Kurve (Ausschnitt von Abbildung 26)

Vergleicht man den experimentell ermittelten Konzentrations-Zeitverlauf der enzymatischen Cyanhydrinsynthese mit dem nach der oben aufgeführten Gleichung berech-

neten Kurvenverlauf, so erkennt man, dass dieser mit der theoretischen Annahme übereinstimmt.

Damit ist bewiesen, dass die oben getroffenen Angaben bezüglich des Mechanismus der enzymatischen Reaktion richtig sind. Es liegt ein Random-Bi-Uni-Mechanismus vor, d.h.:

- die beiden Substrate Benzaldehyd und Kaliumcyanid reagieren zu einem Produkt, dem Mandelonitril
- die Anlagerung der Substrate an das Enzym erfolgt rein zufällig.

### 5.5 Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase

Eine Enzymimmobilisierung ermöglicht eine Wiederverwendung, eine kontinuierliche Prozessführung und einfach nur eine Enzymabtrennung. Zur Immobilisierung werden die Biokatalysatoren unter Erhalt ihrer katalytischen Fähigkeiten an Trägerstoffe oder untereinander gebunden [113]. Weitere Möglichkeiten umfassen die Einhüllung in Polymere, natürliche oder künstliche Matrices, die Umkapselung durch Membranen oder die Reaktionsführung in Membranreaktoren [27, 114]. Über den oft beobachteten Stabilisierungseffekt der immobilisierten Biokatalysatoren hinaus lassen sie sich leicht vom Reaktionsgemisch abtrennen und somit wieder verwenden [115]. Je nach der verwendeten Methode kann die Immobilisierungsart der Biokatalysatoren klassifiziert werden, wie es in Abbildung 3-13 in Kapitel 3.2.1 schematisch dargestellt ist. Für die Herstellung immobilisierter Enzyme gibt es aber kein Standardverfahren. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, können Enzyme auf verschiedener Art und Weise chemisch oder physikalisch immobilisiert werden. Der Immobilisierungserfolg hängt von der Auswahl des Enzyms und der Immobilisierungsmethode ab.

Für die industrielle Anwendung müssen an die Immobilisierungsmethode und die immobilisierten Enzyme folgende Anforderungen gestellt werden:

- einfache Herstellung
- geringe Kosten
- leichte Übertragung aus dem Laboratoriums- in den Betriebsmaßstab

- hohe Aktivität und Stabilität während des Einsatzes
- leichte Regenerierbarkeit bzw. Austauschbarkeit des Enzympräparates
- Anwendbarkeit für eine Vielzahl von Enzymen

Es wurden bereits zahlreiche Verfahren zur Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase erprobt. Die bisher erzielten Ergebnisse auf diesem Gebiet befriedigen aber aus verschiedenen Gründen nicht im vollen Umfang (Kapittel 3.2.3).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. die Immobilisierung von (R)-Oxynitrilase in Hydrogelen untersucht werden.

### 5.5.1 Einschluss von Mandelkernkleie in PVA-Hydrogele

Für die industrielle Anwendung von biokatalytischen Reaktionen sind die Kosten für Biokatalysatoren ein sehr wichtiges Kriterium. Zu Beginn der Immobilisierungsarbeiten wurde Mandelkernkleie in Polyvinylalkohol-Hydrogelen eingeschlossen, weil sie sehr viel preiswerter als reines Enzym ist.

Die Mandelkernkleie wird aus gemahlenen und anschließend entfetteten Bittermandeln gewonnen. Sie fällt bei der Gewinnung von Mandelöl, das in Kosmetika eingesetzt wird, an. Aufgrund der niedrigen Kosten wurde die Mandelkernkleie zur Optimierung der Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase direkt in ein PVA-Hydrogel eingeschlossen (Abbildung 5-28).

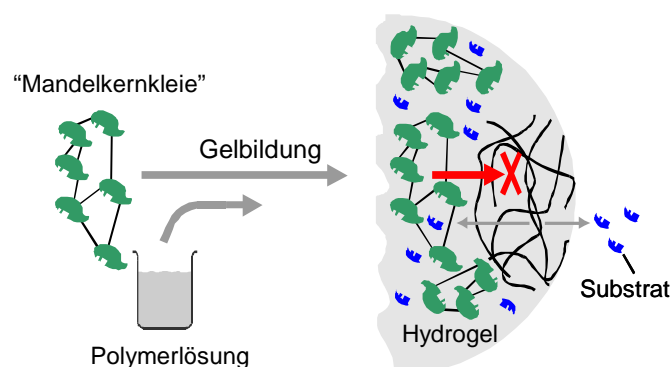


Abbildung 5-28: Einschluss von Mandelkernkleie in ein PVA-Hydrogel

Der Einschluss der Mandelkernkleie in das Gel war erfolgreich. Da aber die Enzymaktivität der Kleie sehr gering war, kommt die Kleie als Enzyersatz für die weiteren Untersuchungen nicht in Frage. Aus diesem Grund muss für die weiteren Untersuchungen das freie, in Lösung befindliche Enzym immobilisiert werden, da die Aktivität des nativen Enzyms im Vergleich zur Mandelkleie viel höher ist. Da aber das Enzym aufgrund seines geringen Molekulargewichtes und somit seiner Größe aus dem PVA-Hydrogel herausdiffundieren kann, muss das Molekulargewicht des Enzyms vor dem Einschluss wie z.B. durch Flockulation, Quervernetzung oder Coquervernetzung vergrößert werden.

In Abbildung 5-29 sind die Schritte der Immobilisierung des Enzyms (R)-Oxynitrilase schematisch dargestellt. Im ersten Schritt erfolgt die Molekulargewichtsvergrößerung durch Flockulation, Quervernetzung und Coquervernetzung und anschließend erfolgt im zweiten Schritt der Einschluss des molekulargewichtsvergrößerten Enzyms in PVA.

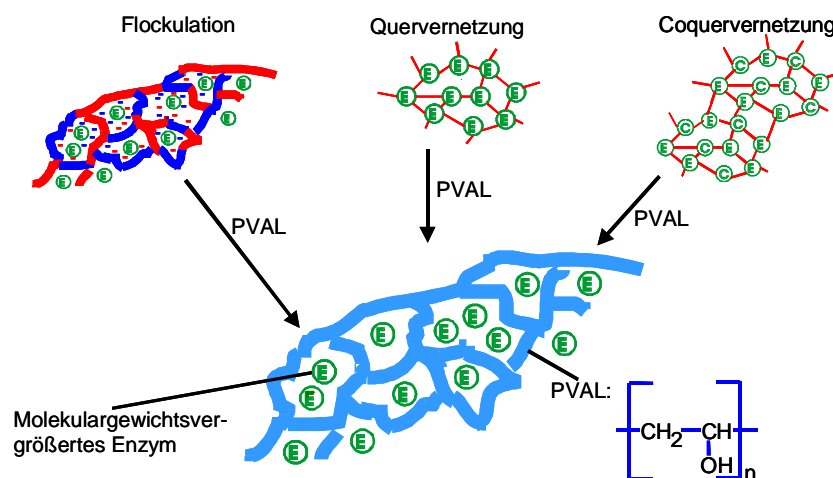


Abbildung 5-29: Ausgewählte Immobilisierungsmethoden für (R)-Oxynitrilase

Das Enzym katalysiert wie oben beschrieben nicht nur die Cyanhydrinbildung, sondern auch die Rückreaktion. Aufgrund des geringeren experimentellen Aufwandes, der niedrigeren Kosten und der Toxizität von KCN wurde für die Optimierung der Immobilisierung die Cyanhydrinspaltung betrachtet.

### 5.5.2 Flockulation des Enzyms mit Polyelektrolyten

Gegensätzlich geladene Polyelektrolyte reagieren zu Polyelektrolytkomplexen, so genannte Symplexe mit definierter stöchiometrischer Zusammensetzung. Die Komplexbildung erfolgt weitgehend unabhängig von der Struktur und dem Molekulargewicht der Polymere. Es werden meist wasserunlösliche, aber hochgequollene Fällungen beim Zusammengeben der wässrigen Polyanion- und Polykationlösungen erhalten [130-132].

Die Symplexbildung kann zur Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase genutzt werden. In Abbildung 5-30 ist die Molekulargewichtsvergrößerung des Enzyms durch Flockulation schematisch dargestellt.

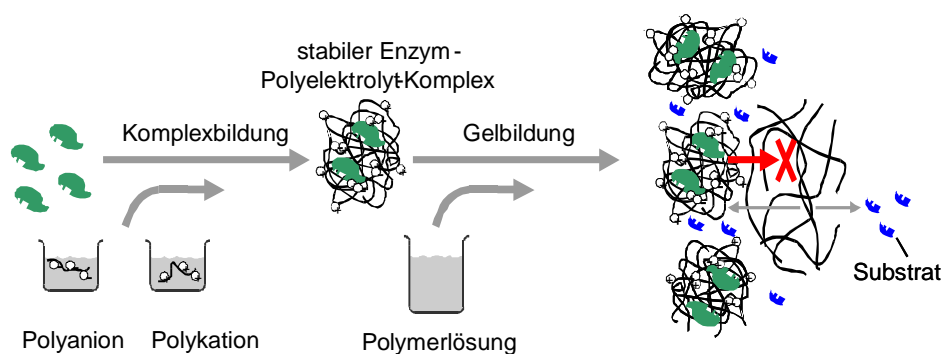


Abbildung 5-30: Flockulation des Enzyms mit Polyelektrolyten und Einschluss in ein PVA-Hydrogel

Es sind nur Polyelektrolyte für die Symplexbildung geeignet, deren Ladungsdichte vom pH-Wert in einem weiten Bereich unabhängig ist und die eine reguläre Molekülgeometrie aufweisen. Eine hohe Ladungsdichte ist außerdem von Vorteil. Aus diesem Grund wurden für die Flockung als Kation Poly(diallyl-dimethyl-ammoniumchlorid) PDADMAC und als Anion Poly(acrylsäure) PAS verwendet. Die verschiedenen Enzym-Polyelektrolyt-Komplexe wurden vom Arbeitskreis DAUTZENBERG bezogen. Diese wurden anschließend in ein PVA-Hydrogel eingeschlossen.

Es stellte sich heraus, dass dieses Immobilisierungsverfahren nicht in Frage kommt, da die Aktivität des immobilisierten Enzyms zu gering war. Es mussten andere Verfahren zur Enzymvergrößerung, wie zum Beispiel die Quervernetzung, untersucht werden.

### 5.5.3 Quervernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd

Das zum Quervernetzen am häufigsten verwendete bifunktionelle Reagenz ist Glutardialdehyd. Die reaktionsfähigen Aldehydgruppen an den beiden Enden des Glutardialdehyds reagieren mit freien Aminogruppen ( $\epsilon$ -Aminogruppen, N-terminale Aminogruppen) des Enzyms, sodass die beteiligten Moleküle kovalent miteinander verknüpft werden (Abbildung 5-31) [75].

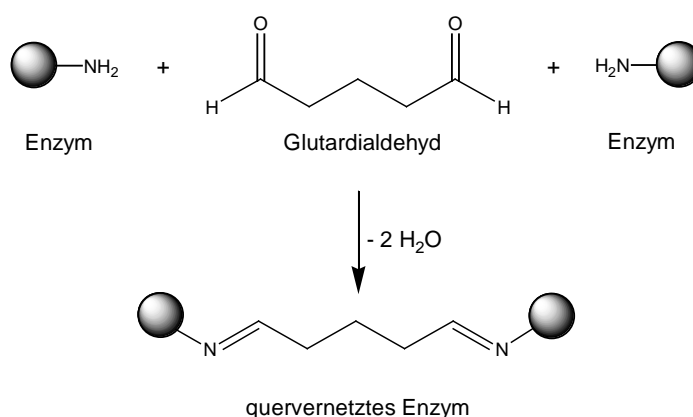


Abbildung 5-31: Vereinfachte Darstellung der Vernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd [75]

Um zu untersuchen, ob das Enzym durch die Reaktion mit Glutardialdehyd geschädigt wird, wurden zu 10  $\mu\text{L}$  Enzymlösung (0,36 mg Protein) unterschiedliche Mengen einer 50%-igen Glutardialdehydlösung gegeben (0  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ ). Die Quervernetzung des Enzyms erfolgte bei einem pH-Wert von 5,5. Man erhielt einen feinen Niederschlag.

Nach der Quervernetzung wurde die Lösung zentrifugiert, um das vernetzte Enzym von der Reaktionslösung abzutrennen. Aufgrund der Feinheit der Partikel war die Trennung des Präzipitats mittels Zentrifuge nicht möglich. Daher wurde die Aktivität des gesamten quervernetzten Gemisches getestet (Abbildung 5-32).

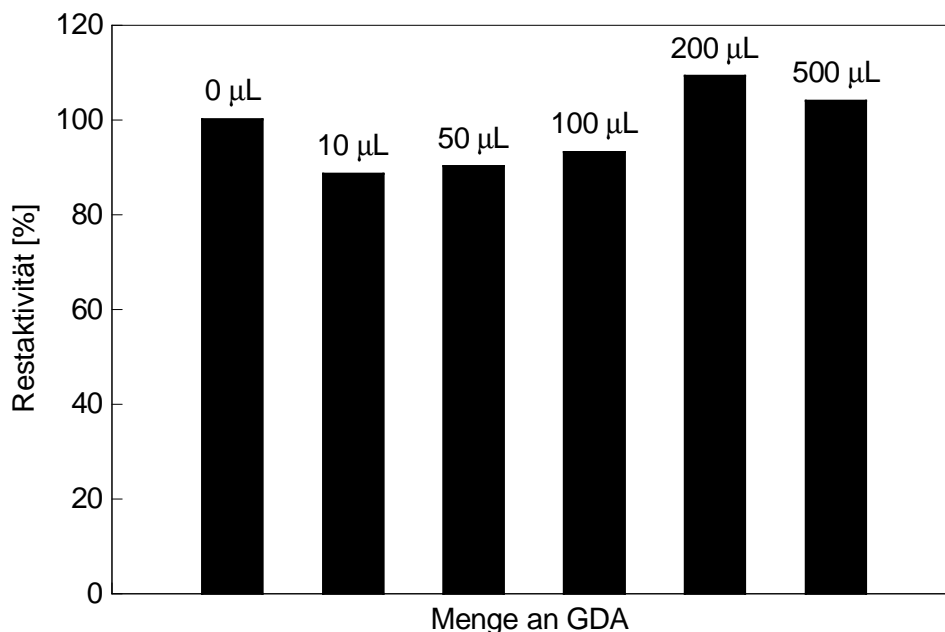


Abbildung 5-32: Variation von Glutardialdehyd ( $\text{pH} = 3,75$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ ;  $c(\text{KCN}) = 3,8 \text{ mM}$ ;  $c(\text{BA}) = 0,1 \text{ mM}$ ), das Enzym wurde mit GDA quervernetzt und anschließend auf Aktivität getestet; 1 = 0  $\mu\text{L}$  GDA, 2 = 10  $\mu\text{L}$  GDA, 3 = 50  $\mu\text{L}$  GDA, 4 = 100  $\mu\text{L}$  GDA, 5 = 200  $\mu\text{L}$  GDA, 6 = 500  $\mu\text{L}$  GDA

Aus Abbildung 5-32 geht hervor, dass die Aktivität des quervernetzten Enzyms genauso groß ist wie die des freien Enzyms, d.h. bei Erhöhung der Glutardialdehydkonzentration bleiben die Aktivitäten nahezu konstant. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Glutardialdehyd keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Quervernetzung von Enzym mit Glutardialdehyd zu einem feinen Niederschlag führt, welchen man nicht abtrennen kann. Daher weiß man auch nicht genau, wie weit die Quervernetzung erfolgt ist. Es könnte sein, dass die Quervernetzung nicht vollständig erfolgt ist, oder dass zu viel GDA zugesetzt wurde und die aktiven Stellen des Enzyms auf Grund sehr starker Quervernetzung blockiert sind.

Um eine Trennung zu ermöglichen, um zu kontrollieren, wie weit die Quervernetzung erfolgt ist, muss das Molekulargewicht des Enzyms noch weiter vergrößert werden. Eine Möglichkeit hierzu ist die Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan (Poly-[2-amino-2-desoxy-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranose]) [107-108] und Glutardialdehyd.

### 5.5.4 Coquervernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd und Chitosan

Chitosan wird durch Deacetylierung aus Chitin hergestellt. Chitin wiederum ist Bestandteil des Exoskeletts aller Gliederfüßer. Es kommt auch in den Zellwänden der Pilze vor. Als Abfallprodukt der muschel- und krebsverarbeitenden Industrie stellt Chitin ein preiswertes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Chitosan dar. Chitosan ist ein wichtiger Grundstoff für die Industrie, es findet dort als Flockungsmittel, als Bindemittel für Textilien und Fasern und als Klebstoff in der Lederindustrie Anwendung [108, 139-141].

Um das Molekulargewicht des Enzyms zu vergrößern, wurde es mit Chitosan und Glutardialdehyd coquervernetzt. Die Reaktionsgleichung ist schematisch in Abbildung 5-33 dargestellt.

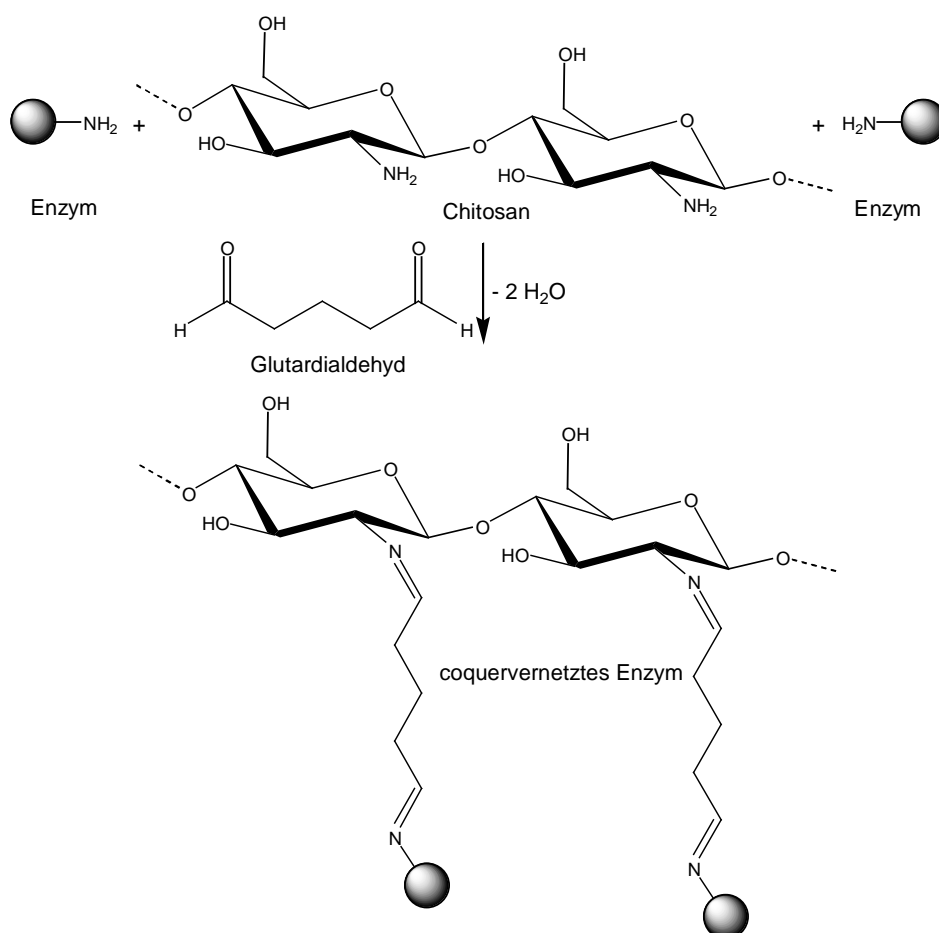


Abbildung 5-33: Coquervernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd und Chitosan [27]



Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass das stöchiometrische Verhältnis zwischen Protein- und Chitosanmenge 1:1 betragen muss, um die besten Resultate zu erzielen [129].

In dieser Arbeit sollte die Menge an Glutardialdehyd bestimmt werden, die eine maximale Menge an Enzym und Chitosan bindet und mit der höchsten Aktivität des Präzipitats einhergeht. Ist die gewählte Glutardialdehydmenge zu hoch, reagiert der Aldehyd hauptsächlich nur mit dem Enzym oder dem Chitosan. Gleichzeitig erhält man ein hochvernetztes Produkt, bei dem die aktiven Zentren des Enzyms für das Substrat nicht mehr zugänglich sind.

Nach der Coquervernetzung wurde das Gemisch zentrifugiert. Sowohl der durch Zentrifugation gewonnene Niederschlag (Pellet) als auch der Überstand wurden auf ihre Aktivität getestet. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mittels Photometer und HPLC. In Abbildung 5-34 sind die Reaktionsverläufe des Pellets dargestellt. Aufgetragen ist die Extinktion über der Zeit.

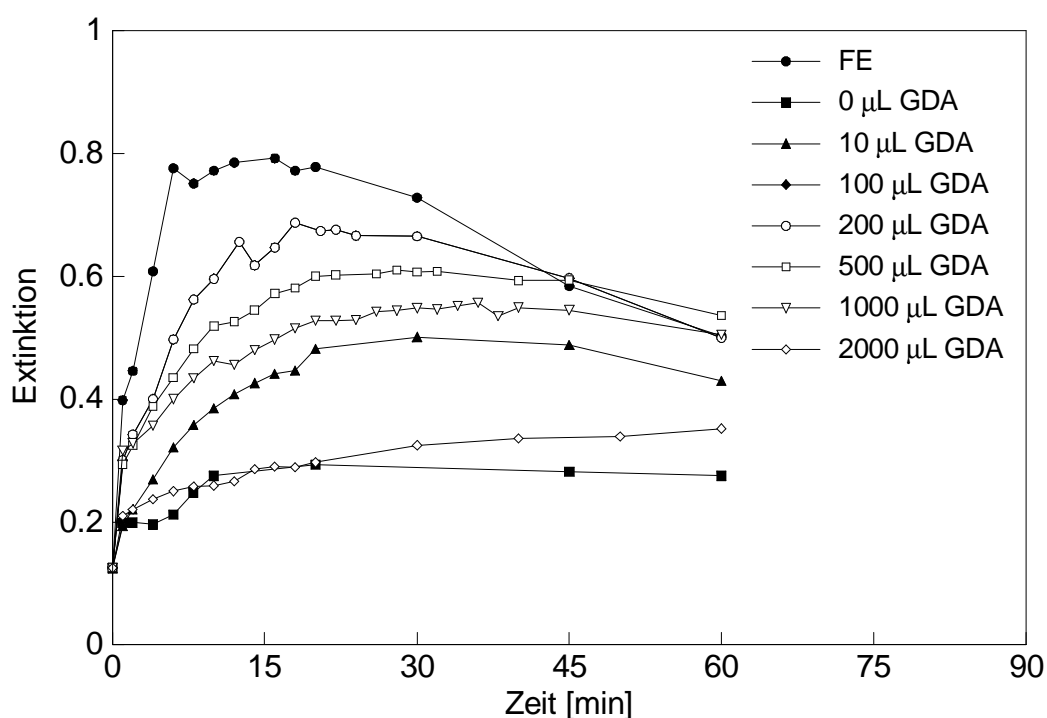


Abbildung 5-34: Aktivitätsvergleich: Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und Glutardialdehyd (Pellet) (FE = freies Enzym)

Man erkennt, dass die Aktivitäten der quervernetzten Enzyme grundsätzlich geringer als die des freien Enzyms sind. Die optimale Menge an einer 50%-igen Glutardialdehyd liegt zwischen 10 und 100  $\mu\text{L}$ . Hier erhält man die höchste Enzymaktivität. In Abbildung 5-35 sind die Ergebnisse des Überstandes dargestellt.

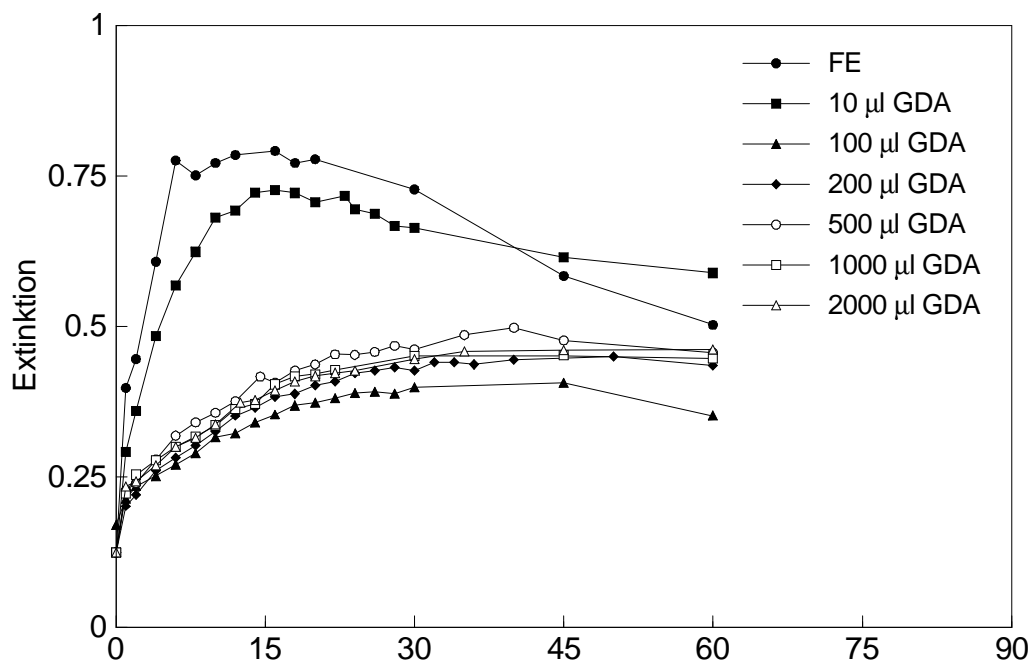


Abbildung 5-35: Aktivitätsvergleich: Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und Glutardialdehyd (Überstand) (FE = freies Enzym)

Betrachtet man die Aktivität des Überstandes, so sieht man, dass bei einer Menge von 10  $\mu\text{L}$  einer 50%-igen Glutardialdehydlösung, die Aktivität fast genau so groß ist, wie die des freien Enzyms. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Enzym nicht vollständig quervernetzt wurde und dass sich im Überstand noch eine große Menge an freiem Enzym befindet. Ab einer GDA -Menge von 100  $\mu\text{L}$  wird die Aktivität des Überstandes viel geringer. Die Steigungen der Kurven liegen bei Zusatz von 100 bis 2000  $\mu\text{L}$  GDA sehr eng bei einander. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse sind in Abbildung 5-36 die Aktivitäten der Pellets und des Überstandes bei unterschiedlichem Vernetzungsgrad einander gegenübergestellt. Die Aktivitäten des Pellets durchlaufen ein Maximum, wobei die höchste Aktivität bei Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Glutardialdehyd erreicht ist. Um sicher zu sein, dass das Maximum tatsächlich bei dieser Glutardialdehydmenge liegt, wurde dieser Bereich in einer weiteren Versuchsreihe noch genauer betrachtet (Abbildung 5-37).

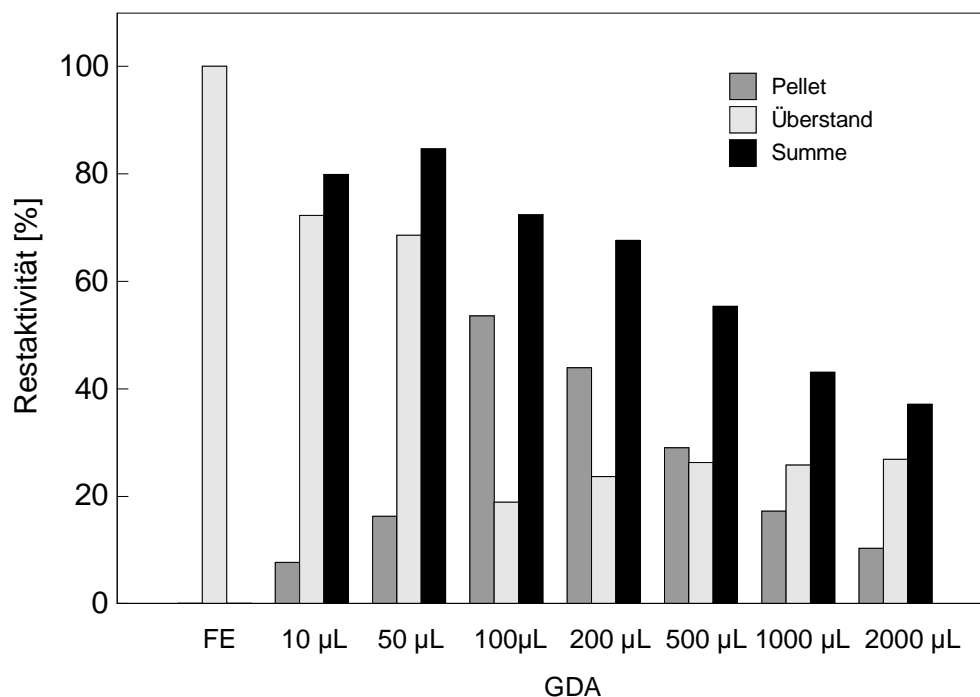


Abbildung 5-36: Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und Glutardialdehyd  
(FE = freies Enzym; Summe = Pellet + Überstand)

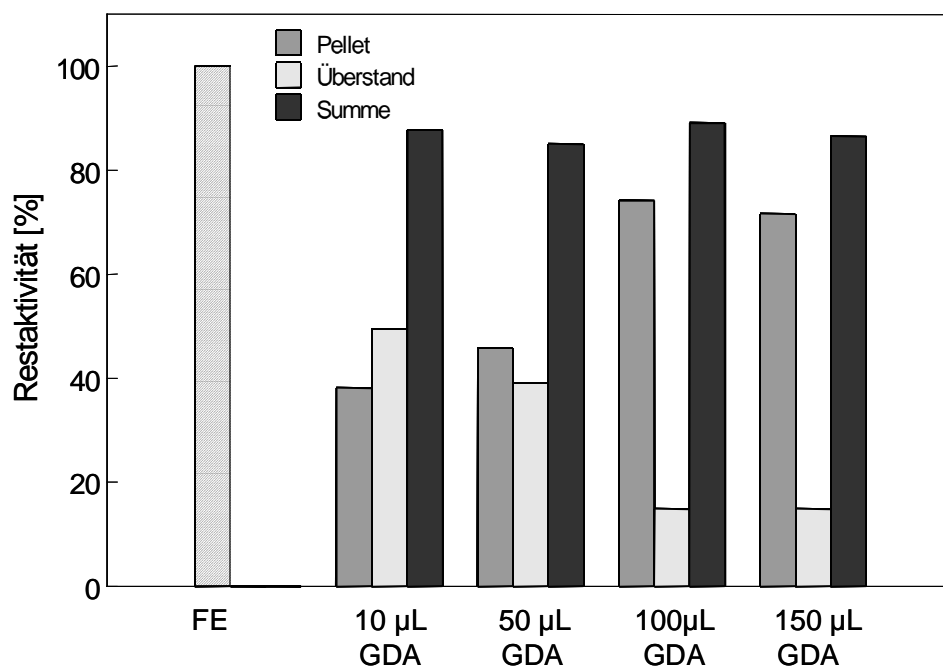


Abbildung 5-37: Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und Glutardialdehyd (10 – 150 µl)

Aus Abbildung 5-37 geht hervor, dass die Aktivität des Pellets bei Zusatz von 150  $\mu\text{L}$  einer 50%-igen Glutardialdehydlösung leicht abnimmt. Aus diesem Grund wurde folgender Reaktionsansatz für die Coquervernetzung festgelegt: 30 mg Protein, 30 mg Chitosan und 100  $\mu\text{L}$  einer 50 % Glutardialdehydlösung. Anschließend wurde das mit GDA und Chitosan coquervernetzte Enzym in PVA-Hydrogel (LentiKats<sup>®</sup>) eingeschlossen.

### 5.5.5 Einschluss des coquervernetzten Enzyms in PVA-Hydrogele

Das nach den oben beschriebenen Bedingungen coquervernetzte Enzym sollte mittels Einschluss in PVA-Hydrogele immobilisiert werden. Dafür wurden Hydrogele der Firma GENIALAB verwendet. Mittels LentiKat<sup>®</sup>-Printer wurden linsenförmige Immobilisate hergestellt und anschließend ihre Aktivität bestimmt. Um eine Diffusion des molekulargewichtsvergrößerten Enzyms aus der Matrix ausschließen zu können, wurde das immobilisierte Enzym über mehrere Stunden gerührt und sowohl die Linsen als auch der Überstand auf ihre Aktivität getestet. Diese wurde mit der Aktivität frisch hergestellter Linsen verglichen (Abbildung 5-38).

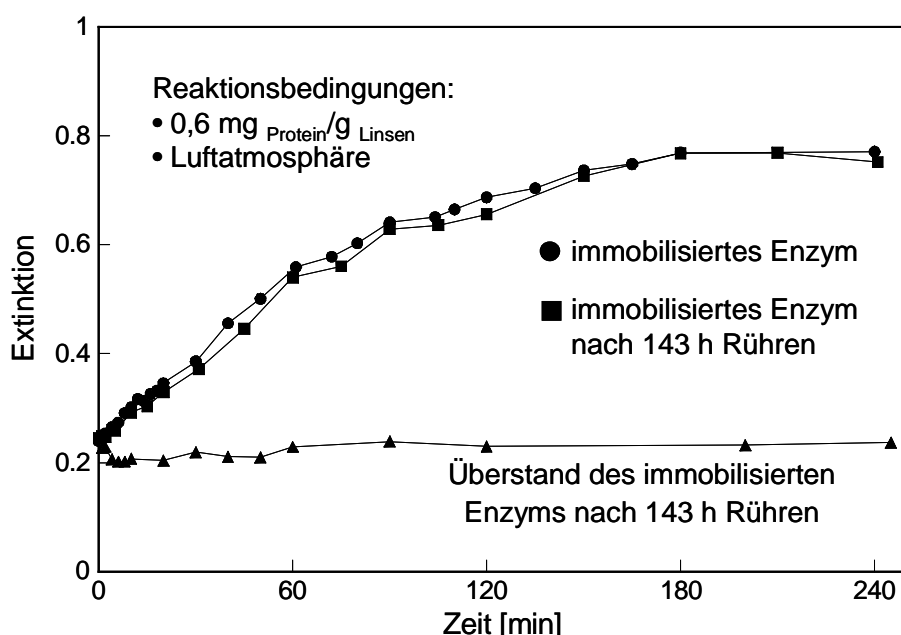


Abbildung 5-38: Rückhaltung des immobilisierten Enzyms in LentiKats<sup>®</sup>

Im Überstand wurde keine Enzymaktivität gefunden. Die Aktivität der Linsen nach

143 Stunden Rühren war genau so groß wie bei den frisch präparierten Linsen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen wurde keine Diffusion des Enzyms aus der Immobilisierungsmatrix beobachtet.

### 5.5.6 Langzeit-Stabilität des immobilisierten Enzyms

In dieser Versuchsreihe sollte für einen späteren technischen Einsatz das Verhalten des immobilisierten Enzyms bei mehrfachem Einsatz unter Luftatmosphäre untersucht werden. Die Untersuchung zur Langzeit-Stabilität des immobilisierten Enzyms wurde in Form von mehreren aufeinander folgenden Batch-Experimenten durchgeführt. Nach jedem Einsatz wurden die Linsen abgetrennt, mehrfach mit dem Stabilizer der Firma GENIALAB gewaschen und wieder eingesetzt. In dieser Versuchsreihe wurde der zeitliche Verlauf der enantioselektiven Cyanhydrinspaltung bei 20°C untersucht. Bei der Auftragung der Extinktion über die Zeit wurde festgestellt, dass bei Mehrfacheinsatz des immobilisierten Enzyms die Steigung der Kurven mit jedem Einsatz sinkt. Um eine Aussagen über die Aktivität machen zu können, wurde aus der Steigung dieser Kurven die Aktivität des immobilisierten Enzyms ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5-39 dargestellt.

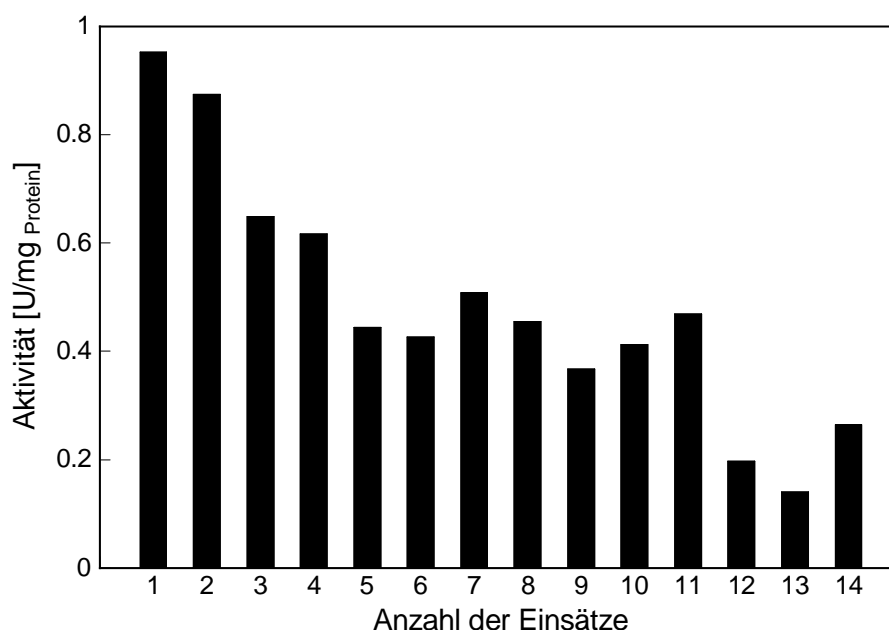


Abbildung 5-39: Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms unter Luftatmosphäre;  
pH = 3,75; T = 20°C

Aus Abbildung 5-39 geht hervor, dass im Laufe des mehrfachen Einsatzes unter Luftatmosphäre die Aktivität drastisch abnimmt. Wie oben schon festgestellt wurde, diffundiert das Enzym nicht aus der Matrix heraus, d. h. die Diffusion kann aus diesem Grund für den Aktivitätsverlust ausgeschlossen werden. Um die Ursache für die Deaktivierung zu finden, muss das System noch weiter optimiert werden.

Hierzu wurde der gleiche Versuch unter Luftatmosphäre im Dunklen durchgeführt (Abbildung 5-40).

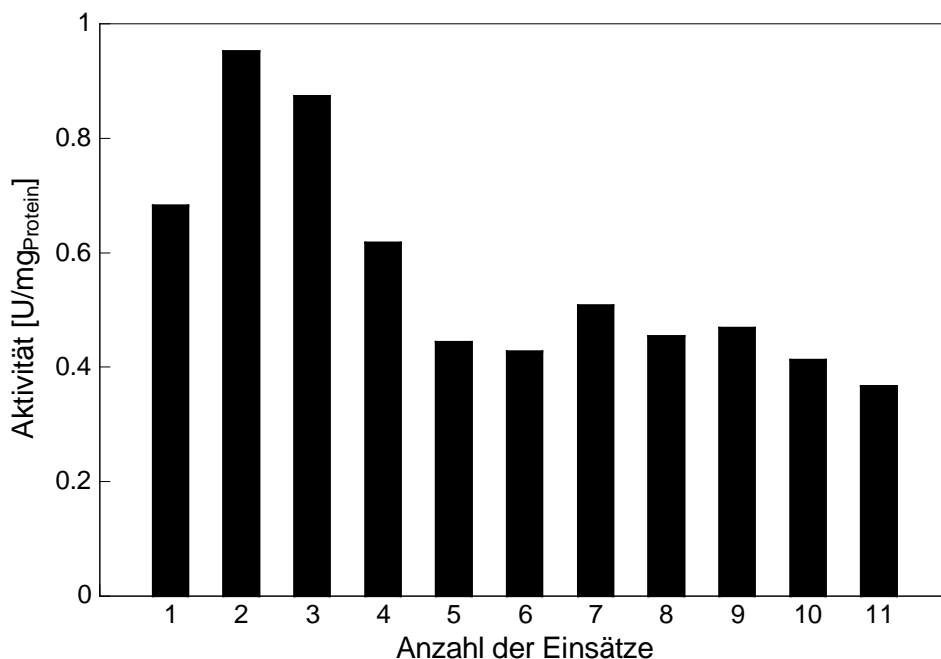


Abbildung 5-40: Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms bei Luftatmosphäre und im Dunklen;  
pH = 3,75; T = 20°C

Auch unter diesen Reaktionsbedingungen nahm die Aktivität der Linsen nach mehrfachem Einsatz ab. Licht hat keine deaktivierenden Eigenschaften auf das Enzym.

Um den Einfluss von Sauerstoff auf das Enzym zu untersuchen, wurden die Versuche unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5-41 und Abbildung 5-42 graphisch dargestellt. In Abbildung 5-41 ist die Extinktion über die Zeit aufgetragen. Die Aktivitäten, die in Abbildung 5-42 dargestellt sind, wurden aus den Steigungen der Kurven in Abbildung 5-41 ermittelt.

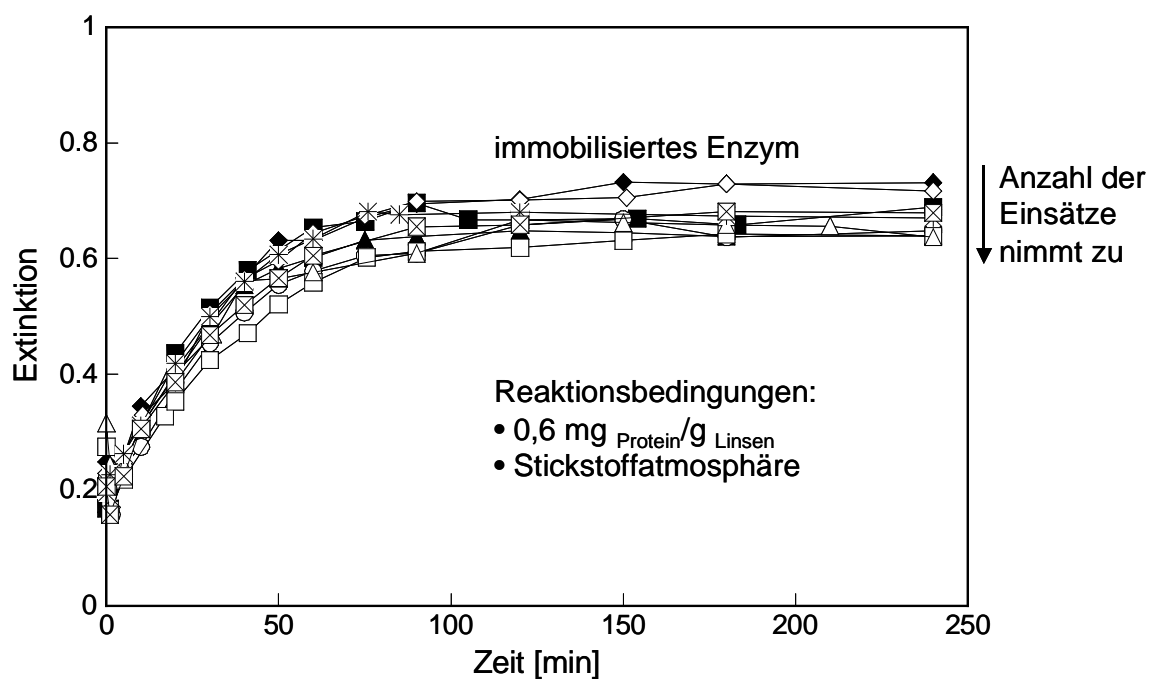


Abbildung 5-41: Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms unter Stickstoffatmosphäre;  
pH = 3,75; T = 20°C

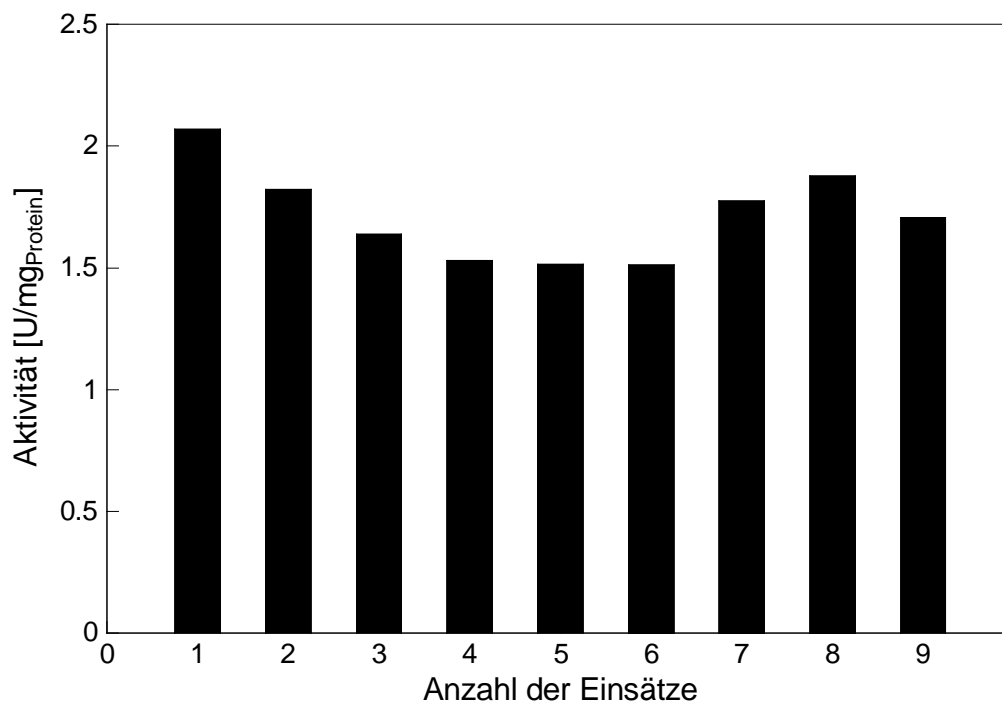


Abbildung 5-42: Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms unter Stickstoffatmosphäre;  
pH = 3,75; T = 20°C

Unter Stickstoffatmosphäre nimmt die Aktivität der Linsen zu Beginn ab. Sie steigt aber beim siebten Einsatz wieder an, so dass dann ein stabiler Zustand erreicht ist. Die in diesem Fall beobachtete Deaktivierung zu Beginn des Versuchs kann an Messungenauigkeiten liegen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Deaktivierung des Enzyms am Luftsauerstoff liegt, d.h. das Enzym ist instabil gegenüber Sauerstoff. Bei einem technischen Einsatz des immobilisierten Enzyms sollte die Reaktionsführung unter Stickstoffatmosphäre stattfinden. Im Falle des freien Enzyms war die Versuchsdauer zu kurz, um eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität durch den Sauerstoff zu beobachten, d.h. die Deaktivierung des Enzyms durch Sauerstoff spielt erst bei längeren Versuchszeiten eine Rolle. Aus diesem Grund wurden die Versuche zur Langzeitstabilität und Enzymbeladung unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Parallel zu diesen Untersuchungen wurde auch bei Degussa AG die Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms im Zwei-Phasen-System (organisch/wässrige System) untersucht. Dort wurde das immobilisierte Enzym 21-mal unter Stickstoffatmosphäre eingesetzt und auf Aktivität getestet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 5-43 dargestellt.

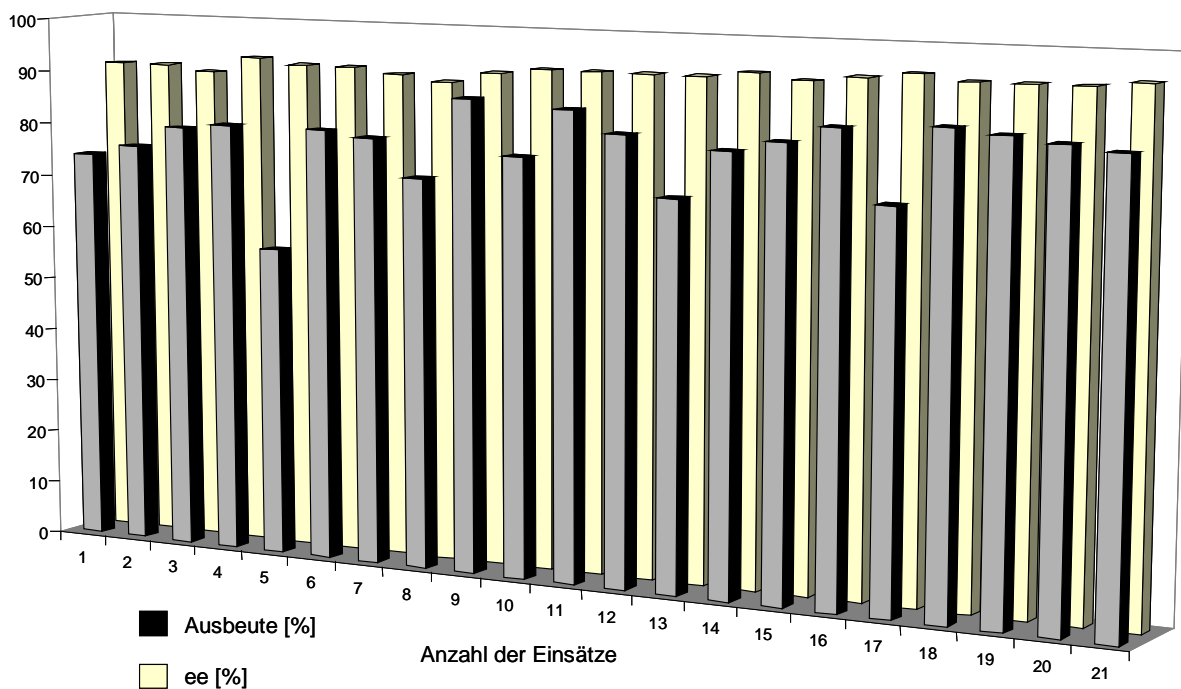


Abbildung 5-43: Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms im Zwei-Phasen-System unter Stickstoffatmosphäre



Aus Abbildung 5-43 geht hervor, dass die Enzymaktivität des immobilisierten Enzyms über 20 mal Einsetzen konstant bleibt, d.h. die immobilisierte (R)-Oxynitrilase ist langzeitstabil. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es uns gelungen ist, eine optimale Immobilisierungsmethode für die (R)-Oxynitrilase zu entwickeln.

## 5.6 Einfluss der Enzymbeladung auf die Enzymaktivität

Durch die Immobilisierung von Biokatalysatoren kann es zu deutlichen Unterschieden zwischen den beobachtbaren Reaktionsgeschwindigkeiten des freien und des immobilisierten Katalysators kommen. Diesem Phänomen kann zum einen eine Inaktivierung des Katalysators durch die Prozedur der Immobilisierung zugrunde liegen, zum anderen aber auch eine Diffusionshemmung. Man muss damit rechnen, dass meist eine Kombination aus beiden Phänomenen auftritt.

Dieser Sachverhalt wurde über die unterschiedliche Enzymbeladung der Lentikats<sup>®</sup> untersucht. Dazu wurden die Linsen mit unterschiedlichen Mengen an Enzym beladen und anschließend auf ihre Aktivität getestet. Die Aktivitäten dieser Lentikats<sup>®</sup> sind in Abbildung 5-44 dargestellt.

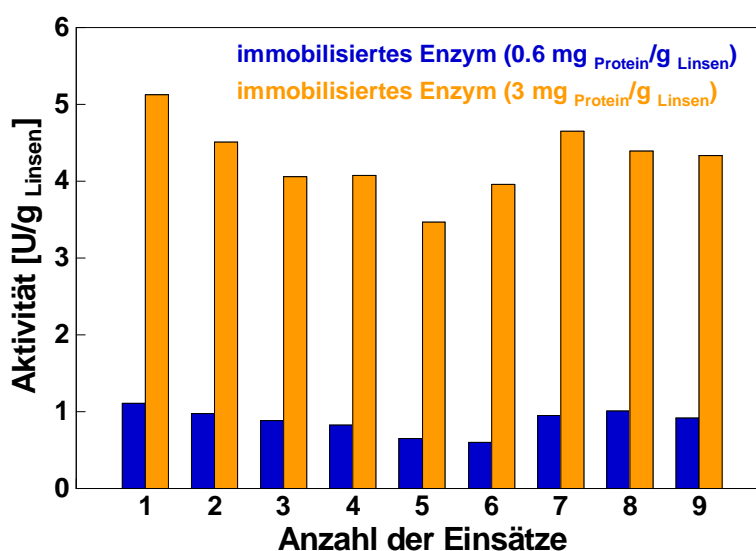


Abbildung 5-44: Einfluss der Enzymbeladung auf die Aktivität bei Stickstoffatmosphäre

In dieser Abbildung ist die Aktivität in  $\text{U/g}_{\text{Linsen}}$  gegenüber der Anzahl der Einsätze dargestellt. Aus Abbildung 5-44 geht hervor, dass bei einer Beladung von 0,6 mg Protein pro Gramm Linsen die Aktivität bei ca. 1  $\text{U/g}_{\text{Linsen}}$  liegt. Bei der Erhöhung der Beladung der Linsen wie z.B. auf 3 mg Protein pro Gramm Linsen beträgt die Aktivität ca. 5  $\text{U/g}_{\text{Linsen}}$ . Das heißt, bei einer fünffachen Beladung der Linsen steigt die Aktivität ebenfalls auf den fünffachen Wert an. In diesen Bereichen steigt die Aktivität der Linsen proportional zu der Enzymbeladung der Lentikats®. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es bei einer Enzymbeladung von 5  $\text{U/g}_{\text{Linsen}}$  zu keiner Diffusionslimitierung der Linsen kommt.

In Abbildung 5-45 ist die Aktivität in Unit pro mg Protein gegenüber der Anzahl der Einsätze aufgetragen.

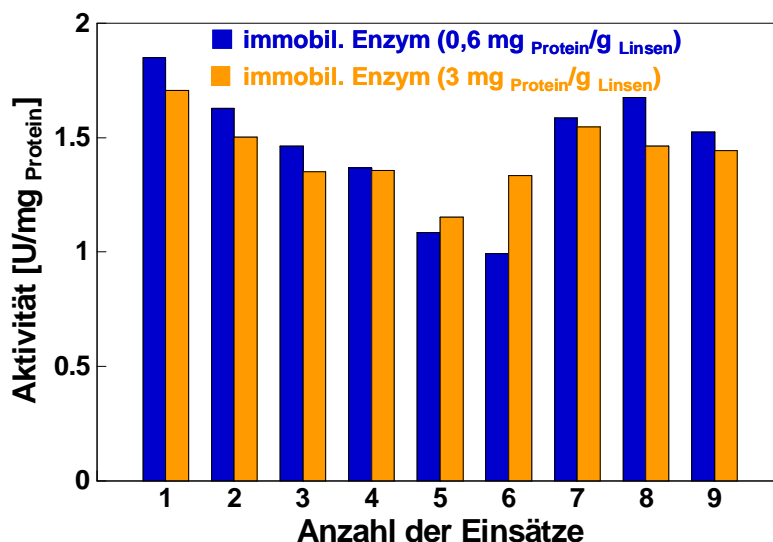


Abbildung 5-45: Einfluss der Enzymbeladung (0,6 bzw. 3  $\text{mg}_{\text{Protein/g}_{\text{Linsen}}}$ ) auf die Aktivität unter Stickstoffatmosphäre

Aus Abbildung 5-45 geht deutlich hervor, dass bei einer Beladung von 0,6 und 3 mg Protein pro Gramm Linsen keine Diffusionshemmung zu beobachten ist. Die Schwankungen der Aktivitäten sind auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.

Nachdem gezeigt wurde, dass die LentiKats® unter Stickstoffatmosphäre langzeitstabil sind und bei einer Beladung von bis zu 3  $\text{mg}_{\text{Protein/g}_{\text{Linsen}}}$  keine Diffusionshemmung

vorliegt, war es Ziel dieser Arbeit, Lentikats<sup>®</sup> mit einer Enzymrestaktivität von bis zu 40 U/g<sub>Linsen</sub> herzustellen. Hierzu wurden Linsen mit unterschiedlicher Beladung hergestellt und diese auf Aktivität getestet. In Abbildung 5-46 ist das Ergebnis dieser Untersuchung zusammengefasst. Aufgetragen ist hierbei die Extinktion über die Zeit.

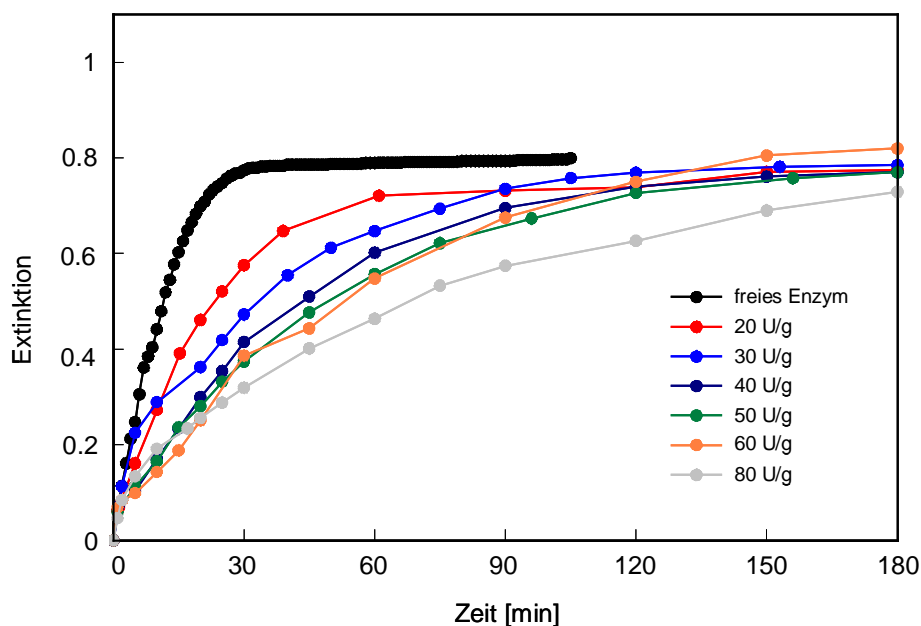


Abbildung 5-46: Einfluss der Enzymbeladung (0,6 bzw. 3 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Linsen</sub>) auf die Aktivität unter Stickstoffatmosphäre

Aus Abbildung 5-46 geht hervor, dass alle Kurven am Anfang linear verlaufen und sich dann asymptotisch einem Maximum nähern. Die Anfangssteigung der Kurven ist umgekehrt proportional zur Beladung, je höher die Beladung, umso kleiner die Steigung. Aus der Anfangssteigung der Kurve wurde die Anfangsaktivität ermittelt und diese über die Beladung aufgetragen (Abbildung 5-47).

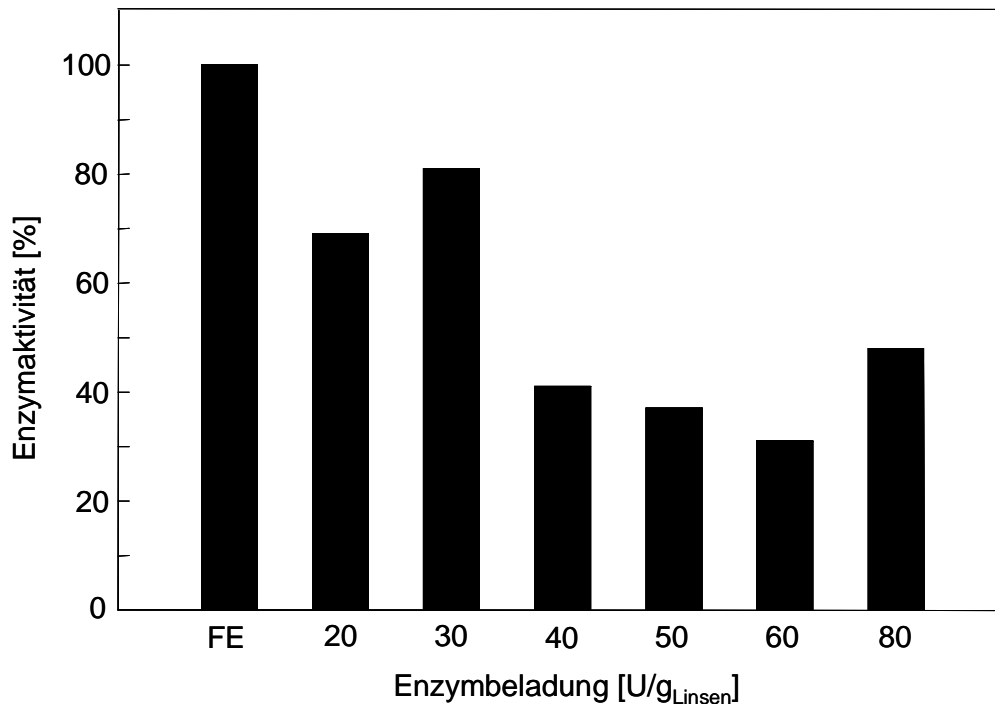


Abbildung 5-47: Einfluss der Enzymbeladung (20-80 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Linsen</sub>) auf die Aktivität

Bei einer Enzymbeladung von 20 U pro Gramm Linsen weisen die Lentikats<sup>®</sup> ca. 70% Restaktivität auf, d.h. dass bei der Immobilisierung des Enzyms ca. 30 % Aktivität verloren gehen. Aus Abbildung 5-47 geht deutlich hervor, dass eine Diffusionslimitierung vorliegt. Ab einer Enzymbeladung von ca. 40 U/g<sub>Linsen</sub> tritt die Diffusionslimitierung auf. Die Linsen weisen nur noch eine Restaktivität von 45% auf. Da aber nicht genau gesagt werden kann, ab welcher Beladung die Diffusionslimitierung eine Rolle spielt, muss extrapoliert werden, bei welcher Beladung die Diffusionshemmung einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit bekommt.

## 5.7 Abschätzung des zu erwartenden Katalysatorwirkungsgrades

Die Geschwindigkeit einer katalytischen Reaktion wird nicht nur von der Aktivität des Katalysators bestimmt, sondern auch von der Geschwindigkeit des äußeren und des inneren Stofftransportes.

Innere Stofftransportlimitierungen, d.h. die Diffusion im Katalysatorpartikel, können nur bei sehr kleinen Katalysatorpartikeln (z.B. sehr feinpulverige Katalysatoren) ver-

nachlässigt werden. Bei größeren Katalysatorpartikeln, wie z.B. in Lentikats® verkapselte Katalysatoren, muss dagegen mit einem Einfluss der Diffusion auf die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit gerechnet werden. Das Zusammenwirken von chemischer Reaktion und Stofftransport wird Makrokinetik genannt. Die ersten Untersuchungen zur Makrokinetik heterogen-katalysierter Reaktionen gehen auf Damköhler [146] und Thiele [147] zurück.

Das Verhältnis zwischen der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit ohne das Vorliegen einer Diffusionslimitierung wird als Katalysatorwirkungsgrad  $\eta$  definiert [148-149].

Neben seiner experimentellen Bestimmung lässt sich der Katalysatorwirkungsgrad unter Annahme bestimmter Randbedingungen auch hinreichend genau berechnen. Für einen kugelförmigen Katalysatorpartikel im stationären Zustand gilt für eine irreversible Reaktion erster Ordnung folgende Gleichung.

$$\eta = \frac{3}{\Phi} \cdot \left( \frac{1}{\tanh \Phi} - \frac{1}{\Phi} \right)$$

Gleichung 16

Dabei ist  $\Phi$  eine dimensionslose Kenngröße, das so genannte THIELE-Modul, auch bekannt als die Damköhlersche Kenngröße 2. Art. Das Verhältnis aus der Diffusionsgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit wird durch das THIELE-Modul ausgedrückt. Das THIELE-Modul ist von der Katalysatorgeometrie  $r_0$ , der Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$ , der MICHAELIS-MENTEN-Konstante und dem effektiven Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{eff}}$  abhängig [148-149].

$$\Phi = \frac{r_0}{3} \sqrt{\frac{V_{\max}}{K_m \cdot D_{\text{eff}}}}$$

Gleichung 17

Der effektive Diffusionskoeffizient  $D_{\text{eff}}$  bringt zum Ausdruck, dass die Diffusion in porösen Festkörpern und Gelen gegenüber der in freier Lösung mehr oder weniger stark gehindert ist. Effektive Diffusionskoeffizienten können durch Messungen be-

stimmt werden [150]. Für die experimentelle Bestimmung des  $D_{\text{eff}}$  können spezielle Messanordnungen wie die Wicke-Kallenbach-Zelle herangezogen werden. Da die beobachtete Verringerung der Aktivität innerhalb der Biokatalysatorperle durch die unzureichende Versorgung der Enzyme mit dem Substrat Benzaldehyd hervorgerufen wird, muss zunächst der effektive Diffusionskoeffizient  $D_{\text{eff}}$  bestimmt werden.

### Theoretische Ermittlung von $D_{\text{eff}}$ :

Die Diffusionsbehinderung innerhalb der Immobilisatperle wird durch das Polymernetzwerk hervorgerufen. Daher geht neben dem Molekulargewichtsparemeter  $a$ , der die Größe des diffundierenden Moleküls beschreibt, die Polymerkonzentration  $V_p$  (angegeben in  $\text{g/cm}^3$ ) in die Formel zur Berechnung von  $D_{\text{eff}}$  ein. Die Gleichung nach White [154], die in dieser Arbeit für die Berechnung des  $D_{\text{eff}}$  verwendet wurde, gilt nur für reine Gele.

$$D_{\text{eff}} = D_0 * e^{-a*V_p}$$

Gleichung 18

Der Parameter  $a$  ist direkt proportional zum Molekulargewicht bzw. Molekülradius des diffundierenden Substrates, d.h. mit zunehmendem Molekulargewicht wird auch  $a$  größer. Da das Molekulargewicht von Benzaldehyd größer ist als von Kaliumcyanid, wird für die Berechnung von  $D_{\text{eff}}$  das Molekulargewicht von Benzaldehyd eingesetzt. Der Parameter  $a$  für Benzaldehyd wurde aus der Literatur [125] aus Abbildung 27 Kapitel 5.2.3 ermittelt. Bei einem Molekulargewicht von 106,12 g/mol ergibt sich für den Parameter  $a$  der Wert: 5,2.

$D_0$  ist der Diffusionskoeffizient in Lösungen. Für eine Vielzahl von wasserlöslichen Verbindungen sind Diffusionskoeffizienten ( $D_0$ ) in der Literatur angegeben [155-156]. Die Messungen für die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten in Lösungen sind meist sehr aufwendig. Da aber die  $D_0$ -Werte mit guter Genauigkeit berechnet werden können, sind die Messungen oft nicht nötig. Die Abweichung der  $D_0$ -Werte aus Messungen und theoretischen Bestimmungen liegt meist unter 15 %.

**Theoretische Ermittlung von  $D_0$ :**

Die einfachste Methode zur Ermittlung von  $D_0$  in wässrigen Lösungen ist die graphische Auftragung der  $D_0$ -Werte, die in der Literatur [155-156] angegeben sind, gegen das Molekulargewicht möglich [125]. Dieser Zusammenhang lässt sich durch die folgende Gleichung beschreiben:

$$D_0 = 0,17 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{T}{M_w^{0,14} \cdot n}$$

Gleichung 19

Für die dynamische Viskosität ( $n$ ) der Lösung wird näherungsweise der Wert für Wasser eingesetzt. Die Versuche mit dem immobilisierten Enzym wurden in dieser Arbeit bei einer Temperatur von 20°C (293 K) durchgeführt. Damit liegt die dynamische Viskosität in diesem Fall bei 1,002 [125, Tabelle 24]. Beim Einsetzen dieser Parameter in Gleichung 19 ergibt sich für  $D_0$  der folgende Wert:

$$D_0 = 0,17 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{293}{106,12^{0,41} \cdot 1,002} = 4,68 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s}$$

Damit kann der effektive Diffusionskoeffizient nach Gleichung 18 berechnet werden, wobei der Polymergehalt des Gels 0,135 g/cm<sup>3</sup> beträgt:

$$D_{eff} = 4,68 \cdot 10^{-7} \cdot e^{5,2 \cdot 0,135} = 2,32 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s}$$

**Ermittlung des THIELE-Moduls:**

Das Verhältnis aus der Diffusionsgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit wird durch das THIELE-Modul ausgedrückt. Es berücksichtigt zusätzlich die Katalysatorgeometrie und die Reaktionsordnung. Für den vorliegenden Fall kugelförmiger Immobilisate mit einem Radius von  $r_0 = 0,015$  cm und MICHAELIS-MENTEN-Kinetik ( $K_m = 0,691$  mM und  $V_{max} = 0,04$  mM/min  $\cdot g_{Linsen}$ ) ergibt sich für das THIELE-Modul der folgende Wert:

$$\Phi = \frac{0,015}{3} \sqrt{\frac{0,04}{0,691 \cdot 2,32 \cdot 10^{-7}}} = 2,497$$

Das Verhältnis aus der aktuell vorliegenden Substratkonzentration  $c_0$  in dem die Perle umgebenden Medium und der Sättigungskonstante  $K_m$  ergibt die dimensionslose Kennzahl  $\beta$ .

$$\beta = \frac{c_0}{K_m}$$

Gleichung 20

$c_0$  = Substratanfangskonzentration ( $c_{0(\text{Benzaldehyd})} = 0,1 \text{ mM}$ )

$K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m = 0,691 \text{ mM}$ )

$$\beta = \frac{0,1}{0,691} = 0,145$$

Gleichung 21

Mit Hilfe des Thiele-Moduls  $\Phi$  und der Kennzahl  $\beta$  kann der zu erwartende Katalysatornutzungsgrad abschließend aus Abbildung 32 Kapitel 6.2 Literatur [125] abgeschätzt werden.

In Tabelle 4 und Tabelle 5 sind alle berechneten und graphisch ermittelten Werte, die für die Ermittlung des Katalysatorwirkungsgrades nötig sind, zusammengestellt. Die Berechnungen in Tabelle 4 beziehen sich auf einen Radius von 0,015 cm, in Tabelle 5 wurde eine Radius von 0.02 cm betrachtet.

Aus Tabelle 4 geht hervor, dass bei einer Katalysatorbeladung von 40 U/g<sub>Linsen</sub> ein Katalysatorwirkungsgrad von 0,40 vorliegt, d.h., es tritt eine Diffusionshemmung von 60 % auf. Bei der experimentellen Untersuchung lag bei einer Beladung von 40°U/g<sub>Linsen</sub> ein Aktivitätsverlust von 55°% vor. Die Differenz könnte dadurch zustande kommen, dass bei der theoretischen Ermittlung des Katalysatorwirkungsgrades von einer Kugel und nicht von einer Linse ausgegangen wird. Bei einer Kugel ist die Diffusionshemmung größer als bei einer Linse.



Tabelle 4: Theoretische Ermittlung des Katalysatornutzungsgrades

$V_{\max}$ [U/g <sub>Linsen</sub> ]	$\Phi$	Wirkungsgrad	V [U/g <sub>Linsen</sub> ]	Aktivitätsverlust [%]
5	0,883	0,78	3,90	22
10	1,248	0,64	6,4	36
15	1,529	0,55	8,25	45
20	1,765	0,5	10,0	50
25	1,974	0,45	11,25	55
30	2,162	0,43	12,9	57
35	2,335	0,41	14,35	59
40	2,497	0,40	16,0	60
45	2,648	0,36	16,2	64
50	2,791	0,34	17,0	66
55	2,928	0,32	17,6	68
60	3,058	0,31	18,6	69
65	3,183	0,3	19,5	70
70	3,303	0,28	19,6	72
75	3,419	0,27	20,25	73
80	3,531	0,26	20,8	74
85	3,640	0,26	22,1	74
90	3,745	0,25	22,5	75
95	3,848	0,25	23,75	75
100	3,948	0,25	25,0	75
150	4,835	0,21	31,5	79
200	5,583	0,18	36,0	82

\* Die Berechnungen in Tabelle 4 beziehen sich auf einen Perlenradius von 0,015 cm.

Tabelle 5: Theoretische Ermittlung des Katalysatornutzungsgrades

$V_{\max}$ [U/g <sub>Linsen</sub> ]	$\Phi$	Wirkungsgrad	V [U/g <sub>Linsen</sub> ]	Aktivitätsverlust [%]
5	1,177	0,72	3,60	28
10	1,664	0,57	5,70	43
15	2,039	0,45	6,75	55
20	2,354	0,38	7,60	62
25	2,632	0,35	8,75	65
30	2,883	0,33	9,90	67
35	3,114	0,31	10,85	69
40	3,329	0,30	12,0	70
45	3,531	0,26	11,70	74
50	3,722	0,23	11,50	77
55	3,904	0,25	13,75	75
60	4,077	0,25	15,00	75
65	4,244	0,23	14,95	77
70	4,404	0,22	15,40	78
75	4,558	0,21	15,75	79
80	4,708	0,2	16,00	80
85	4,853	0,2	17,00	80
90	4,993	0,2	18,00	80
95	5,130	0,19	18,05	81
100	5,264	0,18	18,00	82
150	6,447	0,17	25,50	83
200	7,444	0,13	26,00	87

\* Die Berechnungen in Tabelle 5 beziehen sich auf einen Perlenradius von 0,02 cm.

Bei einem Radius von 0,02 cm liegt bei einer Katalysatorbeladung von 40 U/g<sub>Linsen</sub> ein Katalysatorwirkungsgrad von 0,30 vor, d.h., es tritt eine Diffusionshemmung von 70% auf. Bei der experimentellen Untersuchung lag ein Aktivitätsverlust von 55% vor. Die Differenz könnte dadurch zustande kommen, weil bei der theoretischen Ermittlung des Katalysatorwirkungsgrades von einer Kugel ausgegangen wird und nicht

von einer Linse. Bei einer Kugel ist die Diffusionshemmung größer als bei einer Linse.



## 6 Zusammenfassung

Die Herstellung von optisch aktivem (R)-Cyanhydrinen durch enzymatische Umsetzung von Benzaldehyd mit Kaliumcyanid erfolgt in einem wässrigen Medium unter Reaktionsbedingungen ( $\text{pH} = 3,75$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ), bei denen die unerwünschte Nebenreaktion der racemischen Cyanhydrinbildung nur in vernachlässigbarem Umfang abläuft. Die Enantiomerausbeuten der (R)-Cyanhydrine sind größer 99,5%.

Auf diesem Ergebnis aufbauend wurden bei einem pH-Wert von 3,75 die kinetischen Parameter der (R)-Cyanhydrinsynthese ermittelt. In Bezug auf Benzaldehyd wurde eine konzentrationsabhängige Substrathemmung festgestellt. Kaliumcyanid und Mandelonitril wirken sich nicht hemmend auf die Reaktion aus.

Die Annahme, dass die enzymatische Cyanhydrinsynthese nach einem Random-Bi-Uni-Mechanismus abläuft, wurde dadurch bestätigt, dass die experimentell ermittelten Konzentrations-Zeitverläufe der enzymatischen Cyanhydrinsynthese mit den nach der Gleichung 16 berechneten Kurvenverläufen überein stimmen.

Dem Einsatz isolierter (R)-Oxynitrilase in technischen Verfahren stehen im Allgemeinen ihr hoher Preis, ihre geringe Langzeitstabilität sowie die Schwierigkeiten bei Aufarbeitung und Wiederverwendung im Wege. Daher sollte in dieser Arbeit ein Immobilisierungsverfahren für das Enzym entwickelt werden, welches diese Nachteile behebt. In dieser Arbeit wurde die (R)-Oxynitrilase mit Chitosan und Glutardialdehyd coquervernetzt und anschließend wurde das coquervernetzte Enzym in PVA eingeschlossen. Die Immobilisierung der (R)-Oxynitrilase erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde eine Molekulargewichtsvergrößerung des Enzyms durchgeführt. Die Molekulargewichtsvergrößerung erfolgte durch Coquervernetzung des Enzyms mit Glutardialdehyd und Chitosan. Das molekulargewichtsvergrößerte Enzym zeigte eine Restaktivität von größer 70 %. Im zweiten Schritt wurde das Enzym in Polyvinylalkoholgel eingeschlossen und anschließend zu LentiKats<sup>®</sup> verarbeitet.

Nachdem gezeigt wurde, dass die LentiKats<sup>®</sup> unter Stickstoffatmosphäre langzeitstabil sind und bei einer Beladung von bis zu  $3 \text{ mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Linsen}}$  keine Diffusionshemmung

vorliegt, war es Ziel dieser Arbeit, Lentikats<sup>®</sup> mit einer Enzymrestaktivität von bis zu 40 U/g<sub>Linse</sub> herzustellen. Bei der experimentellen Untersuchung hat sich gezeigt, dass ab einer Enzymbeladung von ca. 40 U/g<sub>Linse</sub> eine Diffusionslimitierung auftritt. Der Katalysatorwirkungsgrad lag in diesem Fall bei 0,45. Da aber nicht genau gesagt werden konnte, ab welcher Beladung die Diffusionslimitierung eine Rolle spielt, musste extrapoliert werden, bei welcher Beladung die Diffusionshemmung einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit bekommt.

Bei der theoretischen Ermittlung des Katalysatorwirkungsgrades im Falle einer Kugel wurde bei einem Radius von 0,015 cm ein Wirkungsgrad von 0,40 errechnet. Die experimentell bestimmten Werte stimmen fast mit dem Theoriewert überein. Die Differenz von ca. 5 % könnte dadurch zustande kommen, dass bei der theoretischen Ermittlung des Katalysatorwirkungsgrades von einer Kugel und nicht von einer Linse ausgegangen wird. Bei einer Kugel ist die Diffusionshemmung größer als bei einer Linse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit eine Immobilisierungsmethode für die (R)-Oxynitrilase entwickelt wurde, die optimale Eigenschaften für die enzymatische Cyanhydrinsynthese aufweist.

## 7 Literatur

- [1] A. Persidis: Chiral-based therapeutics; *Nature Biotechnology*, 15: 594-595 1997
- [2] Internet: Chiral Chemicals <http://www.melness.demon.co.uk/chiral.htm>
- [3] F. Effenberger, S. Förster, H. Wajant: Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis; *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (6): 532-539 2000
- [4] C.G. Kruse, A.N Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby: *Chirality in Industry*, John Wiley and Sons, New York: 279-299 1992
- [5] B. Hörsch: Universität Stuttgart, Dissertation 1990
- [6] T. Ziegler, B. Hörsch, F. Effenberger: Enzyme-catalyzed reactions. 6. A convenient route to (R)-.alpha.-hydroxy carboxylic acids and (2R)-1-amino-2-alkanols from (R)-cyanohydrins; *Synthesis*, (7): 575-578 1990
- [7] J. Brussee: Universität Leiden, Dissertation 1992
- [8] F. Effenberger, B. Hörsch, S. Förster, T. Ziegler: Enzyme-catalyzed reactions. 5. Enzyme-catalyzed synthesis of (S)-cyanohydrins and subsequent hydrolysis to (S)-.alpha.-hydroxy- carboxylic acids; *Tetrahedron Lett.*, 31 (9): 1249-1252, 1990
- [9] M. Hopf: Universität Stuttgart, Dissertation 1990
- [10] F. Effenberger, M. Hopf, T. Ziegler, J Hudelmeyer: Enzyme catalyzed reactions. 10. Synthesis of O-protected (R)-2-hydroxy aldehydes and their hydrocyanation; *Chem. Ber.*, 124 (7): 1651-1659 1991
- [11] W. R. Jackson, H. A. Jacobs, G. S. Jayatilake, B. R. Matthews, K. G. Watson: Stereoselective synthesis of ephedrine and related 2-aminoalcohols of high optical purity from protected cyanohydrins; *Tetrahedron Lett.*, 31 (10): 1447-1450 1990
- [12] J. Brussee, E. C. Roos, A. van der Gen: Bio-organic synthesis of optically active cyanohydrins and acyloins; *Tetrahedron Lett.*, 29 (35): 4485-4488 1988
- [13] J. Brussee, R. A. T. M. van Benthem, C. G. Kruse, A. van der Gen: Magnesium ion mediated stereospecific formation of n-substituted ethanolamines during reductive amination; *Tetrahedron Asymmetry*, 1 (3): 163-166 1990
- [14] J. Brussee, F. Dofferhoff, C. G. Kruse, A. van der Gen: Synthesis of optically active ethanolamines; *Tetrahedron*, 46 (5): 1653-1658 1990
- [15] B. Gutterer: Universität Stuttgart, *Dissertation* 1991

- [16] F. Effenberger, B. Gutterer, J. Syed: Stereoselective Synthesis of (1R,2S)-2-Amino-1,3-diols from (R)-Cyanohydrins; *Tetrahedron Asymmetry*, 6 (12): 2933-2943 1995
- [17] G. Cainelli, E. Mezzana, M. Pannunzio: N-metallo-imines: A new approach to  $\alpha$ -amino alcohols from cyanohydrins.; *Tetrahedron Lett.*, 31 (24): 3481-3484 1990
- [18] G. Cainelli, D. Giacomini, E. Mezzana, M. Pannunzio, P. Zarantonello: N-metallo-imines: A new approach to  $\alpha$ -amino alcohols from aldehydes.; *Tetrahedron Lett.*, 32 (25): 2967-2970 1991
- [19] W. Becker und E. Pfeil: Continuous synthesis of optically active  $\alpha$ -Hydroxynitrilases; *Journal of the American Chemical Society*, 88: 4299-4300 1966
- [20] F. Effenberger, U. Burkard, J. Willfahrter:  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäureester – Edukte zur racemisierungsfreien Synthese von N-substituierten  $\alpha$ -Aminosäuren; *Angew. Chem.*, 95: 50 1983
- [21] W. Becker und E. Pfeil: Über das Flavinenzym D-Oxynitrilase; *Biochem. Z.*, 346: 301-321 1966
- [22] D. J. P. Hogg, M. North, R. B. Stokoe: Synlett, A conformational comparison of cyclo-[(S)-His-(S)-Leu] and cyclo-[(S)-His-(S)-Phe], catalysts for the asymmetric addition of HCN to aldehydes; *Tetrahedron*, 50 (26): 7933-7946 1993
- [23] L. Rosenthaler: Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen; *Biochem. Z.* 14: 238-253 1908
- [24] W. Becker, U. Benthin, E. Eschenhof, E. Pfeil: Zur Kenntnis der Cyanhydrinsynthese II; *Biochem. Z.*, 337: 156-166 1963
- [25] F. Effenberger, B. Hörsch, S. Förster and T. Ziegler: Hydroxynitrile Lyases, Interesting Biocatalysts in Stereoselective Organic Syntheses; *Tetrahedron Lett.*, 31: 1249-1252 1990
- [26] F. Effenberger, T. Ziegler, S. Förster: Enzymkatalysierte Cyanhydrin-Synthese in organischen Lösungsmitteln; *Angew. Chem.*, 99: 491-492 1987, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 26: 458-460 1987
- [27] W. Hartmeier: Immobilisierte Biokatalysatoren; Springer Verlag, Heidelberg; 1986
- [28] H.-H. Hustedt, E. Pfeil: Zur Kenntnis der Cyanhydrinsynthese; *Lieb. Ann. Chem.*, 640: 15-28 1961



- 
- [29] H. Alberts, E. Alberts: Modellversuche zur asymmetrischen Synthese; *Z. Naturforschung.*, 9b (122): 133 1954
- [30] V. Prelog, M. Wilhelm: Der Reaktionsmechanismus und der sterische Verlauf der asymmetrischen Cyanhydrinsynthese; *Helv. Chim. Acta*, 192: 1634-1660 1954
- [31] S. Tsuboyama, A. Ohta, M. Yanagita: An anomalous reaction in bromination of 2-benzylamino-1-butanol; *Tetrahedron Lett.*, 10 (44): 3921-3924 1969
- [32] H. Gountzos, W.R. Jackson, K.J. Harrington: Asymmetric Hydrocyanation of Aldehydes in Crystalline  $\beta$ -Cyclodextrin Complexes; *Aust. J. Chem.*, 39: 1135 1986
- [33] S. Julia, A. Ginebreda: Asymmetric Induction by Phase-Transfer Catalysis using chiral catalysts; *Tetrahedron Lett.*, 23: 2171 1979
- [34] J. Oku, N. Ito, S. Inoue: Asymmetric cyanohydrin synthesis catalyzed by synthetic dipeptides; *Makromol. Chem.*, 180 (4): 1089-1091 1979
- [35] J. Oku, S. Inoue: Asymmetric cyanohydrin synthesis catalyzed by a synthetic cyclic dipeptide; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (5): 229-230 1981
- [36] J. Oku, N. Ito, S. Inoue: Asymmetric cyanohydrin synthesis catalyzed by synthetic dipeptides .2; *Makromol. Chem.*, 183 (3): 579-586 1982
- [37] S. Asada, Y. Kobayashi, S. Inoue: Asymmetric addition of hydrogen cyanide to aliphatic aldehydes catalysed by a synthetic cyclic peptide, cyclo[(S)-phenylalanyl-S(-)-histidyl]; *Makromol. Chem.*, 186: 1755-1762 1985
- [38] Y. Kobayashi, S. Asada, I. Watanabe, H. Hayashi, Y. Motoo, S. Inoue: Asymmetric addition of hydrogen-cyanide to substituted benzaldehydes catalyzed by a synthetic cyclic peptide, cyclo[(S)-phenylalanyl-(S)-histidyl]; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 59 (3): 893-895 1986
- [39] K. Tanaka, A. Mori, S. Inoue: The cyclic dipeptide cyclo[(S)-phenylalanyl-(S)-histidyl] as a catalyst for asymmetric addition of hydrogen-cyanide to aldehydes; *J. Org. Chem.*, 55 (1): 181-185 1990
- [40] J.D. Elliot, V.M.F. Choi, W.S. Johnson: Asymmetric Synthesis via Acetal Templates; *J. Org. Chem.*, 48: 2294-2295 1983
- [41] K. Narasaka, T. Yamada, H. Minamikawa: The asymmetric hydrocyanation of aldehydes with cyanotrimethylsilane promoted by a chiral titanium reagent; *Chem. Lett.*, (10): 2073-2076 1987

- [42] H. Minamikawa, S. Hayakawa, T. Yamada, N. Iwasawa, K. Narasaka: Asymmetric hydrocyanation of aldehydes using chiral titanium reagents; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61 (12): 4379-4383 1988
- [43] M.T. Reetz, S.H. Kyung, C. Bolm, T. Zierke: Enantioselective c-c bond formation with chiral lewis-acids; *Chem. Ind. (London)*, (23): 824-824 1986
- [44] R. Herranz, J. Castro- Pichel, S. Vinuesa, M.T. Garcia- Lopez: An improved one-pot method for the stereoselective synthesis of the (2s,3r)-3-amino-2-hydroxy acids - key intermediates for bestatin and amastatin; *J. Org. Chem.*, 55 (7): 2232-2234 1990
- [45] M.T. Reetz, M.W. Drewes, K. Harms, W. Reif: Stereoselective cyanohydrin-forming reactions of chiral alpha-amino aldehydes; *Tetrahedron Lett.*, 29 (27): 3295-3298 1988
- [46] M.T. Reetz, K.Kessler, A. Jung: Chelation-controlled stereoselective synthesis of cyanohydrins; *Angew. Chem.-int. Editino Eng.*, 24 (11): 989-991 1985
- [47] R. Herranz, J. Castro- Pichel, M.T. Garcia- Lopez: Tributyltin cyanide, a novel reagent for the stereoselective preparation of 3-amino-2-hydroxy acids via cyanohydrin intermediates; *Synthesis-Stuttgart*, (9): 703-705 1989
- [48] N. Mazsuo, N. Ohno: Preparation of optically-active 1-acetoxy-2-aryloxypropionitriles and its application to a facile synthesis of (S)-propranol; *Tetrahedron Lett.*, 26 (45): 5533-5534 1985
- [49] W.L. Nelson, T.R. Burke: Absolute-configuration of glycerol derivatives .5. oxprenol enantiomers; *J. Org. Chem.*, 43 (19): 3641-3645 1978
- [50] H. Ohta, Y. Miyamae, G. Tsuchihashi: Asymmetric hydrolysis of aryloxyacetaldehyde cyanohydrin acetates; *Agric. Biol. Chem.* 50 (12): 3181-3184 1986
- [51] H. Ohta, Y. Miyamae, G. Tsuchihashi: Formation of optically-active aryloxyacetaldehyde cyanohydrin acetates with the aid of a microorganism; *Agric. Biol. Chem.*, 53 (1): 215-222 1989
- [52] A. van Almsick, J. Buddrus, P. Hönicke-Schmidt, K. Laumen, M. P. Schneider: Enzymatic preparation of optically-active cyanohydrin acetates; *J. Chem. Commun.*, (18): 1391-1393 1989
- [53] Y. F. Wang, S. T. Chen, K. K. C. Liu, C. H. Wong: Lipase-catalyzed irreversible trans-esterification using enol esters - resolution of cyanohydrins and syntheses of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate and (S)-propranolol; *Tetrahedron Lett.*, 30 (15): 1917-1920 1989

- 
- [54] F. Effenberger, B. Gutterer, T. Ziegler, E. Eckhardt, R. Aichholz: Enzyme-catalyzed reactions .7. enantioselective esterification of racemic cyanohydrins and enantioselective hydrolysis or transesterification of cyanohydrin esters by lipases; *Lieb. Ann.*, (1): 47-54 1991
- [55] E. Gerstner, E. Pfeil: Flavoenzyme hydroxynitril lyase (d-oxynitrilase); *Hoppe-Seyler's Z.; Physiol. Chem.*, 353 (3): 271-& 1972
- [56] H. Wajant, F. Effenberger: Hydroxynitrile Lyases of Higher Plants; *Biol. Chem.*, 377: 611-617 1996
- [57] M.S. Jorns: Mechanism of catalysis by the flavoenzyme oxynitrilase; *J. Biol. Chem.*; 254 (23): 2145-2152 1979
- [58] K.R. Barwald, L. Jaenicke: D-hydroxynitrile lyase - involvement of prosthetic flavin adenine-dinucleotide in enzyme-activity; *FEBS Lett.*, 90 (2): 255-260 1978
- [59] E. Gerstner: Localization of flavine enzyme d-hydroxynitrile-lyase in seeds of prunoids; *Naturwissenschaften*, 61 (12): 687-687 1974
- [60] L. Jaenicke; J. Preun: Chemical modification of hydroxynitrile lyase by selective reaction of an essential cysteine-SH group with  $\alpha,\beta$ -unsaturated propiophenones as pseudosubstrates; *European Journal of Biochemistry* 138, 319-325; 1984a
- [61] W. R. Jackson, G. S. Jayatilake, B. R. Matthews, C. Whilshire: Evaluation of some cyclic dipeptides as catalysts for the asymmetric hydrocyanation of aldehydes; *Aust. J. Chem.*, 41 (2): 203-213 1988
- [62] W. Becker, H. Freund, E. Pfeil: Stereospecific synthesis of d-hydroxynitriles and optically active ethanolamines; *Angew. Chem.*, 4 (12): 1079-& 1965
- [63] U. Niedermeyer, Universität Düsseldorf; *Dissertation* 1989
- [64] U. Niedermeyer, U. Kragl, M.R. Kula, C. Wandrey, K. Makryaleas, K.H. Drauz: *Europ. Pat.anmeldung Nr. 036063A* 1989
- [65] F. Effenberger; T. Ziegler, S. Foerster: Enzyme-catalyzed cyanohydrin preparation in organic solvents; *Angew. Chem.*, 99 (5): 491-492 1987
- [66] E. Kiljunen, L. T. Kanerva: Novel (R)-oxynitrilase sources for the synthesis of (R)-cyanohydrins in diisopropyl ether; *Tetrahedron: Asymmetry*, 8: 1225-1234 1997
- [67] L. Michaelis, M. L. Menten: Die Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Z.* 49: 333-369 1913

- [68] H. Bisswanger: Enzymkinetik; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Basel, Cambridge, New York 2000
- [69] H. J. Segel: Enzyme Kinetics; Wiley Interscience Publication, New York, 826 1975
- [70] W. W. Cleland: The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products; *Biochem. Biophys. Acta*, 67: 104-137 1963
- [71] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato: Biocatalysis: Immobilized cells and enzymes; *J. Mol. Catalysis*, 37: 1-24 1986
- [72] I. Kasche, Y. Yugeta: Correlation of experimental and theoretical data for artificial and natural systems with immobilized biocatalysts; *Enzym Microb. Technol.*, 5: 2-13 1983
- [73] A. M. Klibanov: Immobilized enzymes and cells as practical biocatalysts; *Science*, 219: 722-727 1983
- [74] A. Rosevear: Immobilised biocatalysts – a critical review. I.; *Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B: 127-150 1984
- [75] D. R. Walt, V. I. Agayn: The chemistry of enzyme and protein immobilisation with glutaraldehyd; *Trends in anal. Chem.*, 13 (10): 425-431 1994
- [76] U. Prüsse: Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter Katalysatoren; TU Braunschweig, Dissertation 2000
- [77] K.-D. Vorlop: Entwicklung und Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G and Synthese von L-Tryptophan; TU Braunschweig, Dissertation 1984
- [78] K. V. Vorlop, J. Klein : Immobilisation techniques: cells ; *Comprehensive Biotechnology 2. Moo-Joung M.*, Pergamon Press, Oxford; 1985
- [79] A. Muskat , J. Beyersdorf, K. D. Vorlop: Poly(carbamoylsulfonate), a material for immobilization: synthesis, diffusion and mechanical properties; *Biotechnol Tech.*, 7: 591-596 1993
- [80] V. I. Lozinsky, E. S. Vainerman, L. V. Domotenko, A. M. Mamtsis, E. F. Titova, E. M. Belavtseva, S. V. Rogozhin: Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing poly(vinylalcohol) aqueous solutions; *Colloid & Polymer Sci.*, 264: 19-24 1986

- 
- [81] P. Gemeiner, L. Kurillova, O. Markovic, A. Malovikova, D. Uhrin, M. Ilavsky, V. Stefuca, M. Polakovic, V. Bales: Calcium pectate gel beads for cell entrapment; 3. Physical properties of calcium pectate and calcium alginate gel beads; *Biotechnol Appl. Biochem.*, 13: 335-345 1991
- [82] K. D. Vorlop, J. Klein: Entrapment of microbial cells in chitosan; *Methods Enzymol.*, 135: 259-268 1987
- [83] B. Mattiasson: Immobilization methods; Immobilized Cells and Organelles; *CRC Press. Boca Raton*, 1983
- [84] B. Hahn-Hägerdahl, B. Mattiasson: Azide sterilization of fermentation media; ethanol production from glucose using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*; *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.*, 14:140-143 1982
- [85] B.L. Maiorella, H.W. Blanch, C.R. Wilke: Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes; *Biotechnol Bioeng.*, 26:1003-1025 1984
- [86] O. Ariga, K. Itoh, Y. Sano, M. Natura: Encapsulation of biocataysts with PVA capsules; *Ferment Bioeng.*, 78: 74-78 1994
- [87] K. D. Vorlop, A. Muscat, J. Beyersdorf: Entrapment of microbial cells within the polyurethane hydrogel beads with the advantage of low toxicity; *Biotechnol. Tech.*, 6: 483-488 1992
- [88] K. D. Vorlop, P. Remmers: Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren; *Deutsches Patent DE 4027218*; 1990
- [89] C. A. Finch: Polyvinyl alcohol – developments; 2. Auflage, John Wiley & Sons; Weinheim; 1992
- [90] H. Haschke, I. Tomka, A. Keilbach: Systematische Untersuchung zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 1. Mitt. Zur tatsächlichen biologischen Abbaubarkeit von sogenannten bioabbaubaren Kunststofffolien; *Monatsheft für Chemie*, 129: 253-279 1998
- [91] H. Haschke, I. Tomka, A. Keilbach: Systematische Untersuchung zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 2. Mitt. Zur biologischen Abbaubarkeit von auf Polyvinylalkohol basierenden Verpackungsfolien; *Monatsheft für Chemie*, 129: 365-386 1998
- [92] H. Haschke, I. Tomka, A. Keilbach: Systematische Untersuchung zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 3. Mitt. Neue Polyvinylalkohol-Stärke-Acetal-Folien; *Monatsheft für Chemie*, 129: 487-507 1998
- [93] P. J. Sträßner: Optimierung des mikrobiellen Abbaus von Polyvinylalkohol, Technische Universität Hamburg-Harburg; *Dissertation* 1995

- [94] Hoechst: Hoechst High Chem<sup>®</sup>. Mowiol<sup>®</sup> Polyvinylalkohol, *Informationsbro-schüre*, Bezug über Clariant GmbH, Division Celluloseether & Polymerisate, D-65926 Frankfurt am Main; 1991
- [95] M. Jekel, A. Buhr, T. Willke, K. D. Vorlop: Immobilization of biocatalysts in Len-tiKats<sup>®</sup>; *Chem. Eng. Tech.*, 21 (3): 275-278 1998
- [96] K. Buchholz, V. Kasche: Biokatalysatoren und Enzymtechnologie; VCH-Verlag, Weinheim; 1997
- [97] E. Pfeil, W. Becker: Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Cyanhydri-nen; *Deutsches Patent DE 13 00 111 B*; 1969
- [98] F. Effenberger, S. Heid: (R)-oxynitrilase catalyzed synthesis of (R)-ketone cya-nohydrins; *Tetrahedron Asymmetry*, 6 (12): 2945-2952 1995
- [99] P. Methe et al., US-PS 5, 122, 462
- [100] J. Am. Chem. Soc., 1999, 120, 8587
- [101] F. Effenberger, T. Ziegler, S. Förster: Process for the production of optically active cyanohydrins; *US-Patent* 4, 859, 784
- [102] US-Patent 5, 177, 242
- [103] US-PS 5, 122, 462
- [104] N.W. Fadnavis, K. Koteswar: An unusual reversible sol-gel transition phe-nomenon in organogels and its application for enzyme immobilization in gelatin membranes; *Biotechnol. Prog.*, 15 (1): 98-104 1999
- [105] N.W. Fadnavis, K. Koteswar J. Am. Chem. Soc., 1999, 120, 8587
- [106] Organikum; 18., Organische Grundlagen, berichtigte Auflage, Deutscher Ver-lag der Wissenschaften, Berlin 1990
- [107] R. A. A. Muzzarelli: Chitin; *Pergamon Press*, New York; 1977
- [108] C. Muzzarelli, RAA. Muzzarelli: Chitin related food science today (and two cen-turies ago); *Agro food industry HI-TEC.*, 14 (5): 39-42 2003
- [109] M. Biselli, U. Kragl, C.Wandrey: Reaction Engineering for Enzyme-Catalized Biotransformations; Kap. A4 in Drauz, K., Waldmann, H. (Editor); *Enzyme Ca-talysis in Organic Synthesis*, VCH-Weinheim (u.a.); 1995
- [110] I Virkajärvi, M. Linko, Immobilization: A Revolution in Traditional Brewing; *Naturwissenschaften*, 86: 112-122 1999
- [111] K. Stein: Enzyme – Werkzeuge in der analytischen Chemie; *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, 44: 886-890 1996
- [112] J. Lalonde; Enzyme Catalysis: Cleaner, Safer, Energy Efficient; *Chem. Eng.*, 9: 108-112 1997

- 
- [113] W. Tischer, F. Wedekind: Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Biocatalysis From Discovery to Application (Fessner W.-D. Ed.); Topics in Current Chemistry*, 200: 95-126 1999
- [114] U. Kragl, C. Wandrey: Biocatalytic Reactions with Immobilized Enzymes; *"Handbook of Heterogeneous Catalysis"* Vol. 5 (Ertl, G., Knözinger, H., Weitkamp, J. eds.). VCH-Weinheim; 1997
- [115] M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp: Effiziente heterogene Biokatalysen durch den Einschluß von Lipasen in hydrophoben Sol-Gel-Materialien; *Angew. Chem.* 107(3): 373-376 1995
- [116] W. O. Herrmann, W. Haenel: Über den Poly-vinylalkohol; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 60: 1658-1663 1927
- [117] H. Staudinger, K. Frey, W. Starck: Hochmolekulare Verbindungen, 9. Mitteilung: Über Poly-vinylacetat und Poly-vinylalkohol; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 60: 1782-1792 1927
- [118] V. I. Lozinsky, F. M. Plieva: Cell entrapment within PVA-cryogel carriers: state of art and potentials, in: *Proceedings of the International Workshop Bioencapsulation V* (Hrsg. H. Dauzenberg, D. Poncelet); Potsdam, 13-22 1996
- [119] H. Neukom: Über Nebervalenzgele des Polyvinylalkohols; *Helv. Chim. Acta*, 32: 1233-1238 1949
- [120] Co. Kuraray (Erf.: A. Shinozaki, K. Abe): Process for manufacturing spherical hydrated gel containing microorganism immobilized therein, *EP, Nr. 0303122*, 1988
- [121] K.-D. Vorlop, P. Remmers (Erf.): Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren, *EP, Nr. 0478097*, 1991
- [122] V.I. Lozinsky, E. V. Solodova, A.L. Zubov, ;I.A. Simenel: Study of cryostructuration of polymersystems. XI. The formation of PVA cryogels by . freezing-thawing the polymer aqueous solutions containing additives of same polyols; *J. Appl. Polymer Sci.*, 58: 171-177 1995
- [123] V.I. Lozinsky: Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions; *Russ. Chem. Rev.*, 67: 573-586 1998
- [124] M. Kunz; Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt (2000)
- [125] K.-D. Vorlop: Entwicklung und Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G and Synthese von L-Tryptophan. TU Braunschweig, Dissertation 1984
- [126] Hoechst: Hoechst High Chem® Mowiol® Polyvinylalkohol.

- Informationsbroschüre, Bezug über Clariant GmbH, Division Celluloseether & Polymerisate, D-65926 Frankfurt am Main 1991
- [127] U. Prüsse: Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkoholverkapselter Katalysatoren; TU Braunschweig, Dissertation 2000
  - [128] L. Michaelis und M.L. Menten: Die Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Z. (Biochemische Zeitschrift)*, 49: 333-369 1913
  - [129] U. Jahnz.: Screening-Automation auf Basis hohlkugelverkapselter Zellen und enzymatische Bildung von Difuctoseanhydrid III aus Inulin unter thermophilen Bedingungen (Screening, Charakterisierung, Immobilisierung). TU Braunschweig, Dissertation 2001
  - [130] D. Horn: Die Bestimmung der Ladungsdichte organischer Polyelektrolyte; *Beitrag zum GDCh-Informationstag* Nr. 635 1990
  - [131] B. Philpp u.a.: Polyelektrolyte - Komplexe – Bildungsweise, Struktur und Anwendungsmöglichkeiten; *Z. Chem.*, 22: 1-14 1982
  - [132] H. Dautzenberg, B. Philipp, C. Seidel: Polyelektrolytes: formation, characterization and application; München: Carl Hanser Verlag; 1994
  - [133] F. Effenberger: Enzyme-catalyzed preparation and synthetic applications of optically active cyanohydrins; *Chimia*, 53 (1-2): 3-10 1999
  - [134] F. Effenberger, S. Heid: Enzyme-catalyzed reactions. 22. (R)-Oxynitrilase catalysed synthesis of (R)-ketone cyanohydrins; *Tetrahedron Asymmetry*, 6 (12): 2945-2952 1995
  - [135] H. Lineweaver, D. Burk: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-667 1936
  - [136] U. Niedermeyer and MR Kula: Hydroxynitrile Lyases, Interesting Biocatalysts in Stereoselective Organic; *Angew. Chem.*, 102: 423 1990
  - [137] U. Niedermeyer and MR Kula: Hydroxynitrile Lyases, Interesting Biocatalysts in Stereoselective Organic; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; 29: 386 1990
  - [138] T. Ohta, J.C. Ogbonna, H. Tanaka, M. Yajima: Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 2. Ethanol and L-lactic acid Production without heat and filter sterilization; *Appl Microbiol Biotechnol.* 42: 246-250 1994



- 
- [139] RAA. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanuelli, S. Mariotti, MG. Muzzarelli: The characterization of chitins and chitosans of animal and fungal origin and perspectives of applications; *It. J. Biochem.*, 30 (2): 167-167 1981
- [140] RAA. Muzzarelli: Immobilization of enzymes on chitin and chitosan; *Enzyme and Microbial Technology*, 2 (3): 177-184 1980
- [141] RAA. Muzzarelli, G. Barontini, R. Rocchetti: Isolation of lysozyme on chitosan; *Biotech. and Bioeng.*, 20 (1): 87-94 1978
- [142] K. NarAsaka, M. Inoue, T. Yamada, J. Sugimori, N. IwAsawa: Asymmetric diels-alder reaction by the use of a chiral titanium catalyst with molecular sieves-4a - remarkable solvent effect on the enantioselectivity; *Chem. Lett.*, (12): 2409-2412 1987
- [144] S. Furusaki, T. Nozawa, T. Isohara, T. Furuya: Influence of substrate transport on the activity of immobilized papaver-somniferum cells; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29 (5): 437-441 1988
- [145] S. Furusaki: Engineering aspects of immobilized biocatalysts; *J. Chem. Eng. Jp*, 21 (3): 219-230 1988
- [146] G. Damköhler: Influence of diffusion, fluid flow, and heat transport on the yield in chemical reactors, *Der Chemie Ingenieur*, 3: 359-485 1937
- [147] E.W. Thiele: Relations between catalytic activity and size of particle; *Ind. Eng. Chem.*, 31: 916-920 1939
- [148] M. Baerens, H. Hoffmann, A. Renken: Lehrbuch der Technischen Chemie Band 1: Chemische Reaktionstechnik, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1992
- [149] K. Dialer, U. Onken, K. Loschonski: Grundzüge der Verfahrenstechnik und Reaktionstechnik, Carl Hanser Verlag, München 1986
- [150] K.-D. Vorlop: Bio- und edelmetallkatalytischer Abbau von Nitrit und Nitrat im Trinkwasser mittels Wasserstoff; Jahrbuch Biotechnologie, Band 4, (Hersg.: P. Präve, M. Schlingmann, K. Esser, R. Thauer, F. Wagner), Carl Hanser Verlag, München: 307-349 1992
- [151] F. Effenberger: Synthesis and reactions of optically-active cyanohydrins: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33 (15-16): 1555-1564 1994
- [152] R. J. H. Gregory: Cyanohydrins in nature and the laboratory: Biology, preparations, and synthetic applications; *Chem. Rev.*, 99 (12): 3649-3682 1999
- [153] R.J.H. Gregory, S.M. Roberts, J.V. Barkley, S.J Coles, M.B. Hursthouse, D.E. Hibbs: Bicyclo [3.2.0]hept-2-en-6-one cyanohydrins: preparations by chemical

hydrocyanation, and enantio- and diastereoselective biotransformation by the hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus* in the form of almond meal; *Tetrahedron Lett.*, 40 (41): 7407-7411 1999

[154] M.L. White, G.H. Dorion: Diffusion in a crosslinked acrylamide polymer gel; *J. Polym. Science* 55 (162): 731-& 1961

[155] P.A. Johnson, Al Babb: Liquid diffusion of non electrolytes; *Chem. Rev.* 56 (3): 387-453 1956

[156] Handbook of Chemistry and Physics CRC Press, Cleveland, F 60 1975

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

a:	Molekulargewichtsparemeter, der die Größe des diffundierenden Moleküls beschreibt
A, BA:	Benzaldehyd
$\beta$ :	dimensionslose Kennzahl
C:	Spacer
c:	Konzentration [mol/L]
c(B):	Konzentration der Blausäure [mol/L]
c(BA):	Konzentration des Benzaldehyd [mol/L]
$D_{\text{eff}}$ :	effektiven Diffusionskoeffiziente in einem Gel [ $\text{cm}^2/\text{min}$ ]
$D_0$ :	Diffusionskoeffiziente in Wasser [ $\text{cm}^2/\text{min}$ ]
E:	Enzym
ee:	enantiomeric excess
ES:	Enzym-Substrat-Komplex
FAD:	Flavin-Adenin-Dinucleotid
GC:	Gaschromatographie
GDA:	Glutardialdehyd
HCN:	Blausäure
HPLC:	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
k:	Geschwindigkeitskonstante
KCN:	Kaliumcyanid
$K_m$ :	Michaelis-Menten-Konstante
$K_m^A, K_m^{BA}$ :	Michaelis-Menten-Konstante für Benzaldehyd [mol/L]
$K_m^B$ :	Michaelis-Menten-Konstante für die Blausäure [mol/L]
$K_i^{BA}$ :	Inhibierungskonstante für Benzaldehyd [mol/L])
MN:	Mandelonitril
Mw:	Molekulargewicht [g/mol]
$\eta$ :	Katalysatorwirkungsgrad
$n$ :	dynamische Viskosität
$\Phi$ :	THIELE-Modul
P:	Produkt

PCS:	Polycarbamoylsulfonat
PEG:	Polyethylenglycol
PVA:	Polyvinylalkohol
PVAc:	Polyvinylacetat
$r_0$ :	Radius [cm]
S:	Substrats
t:	Reaktionszeit
TON:	Turnover Numbers
U:	Unit 1U = $\mu\text{mol}$ Benzaldehyd/min
V:	Reaktionsgeschwindigkeit
$V_p$ :	Polymerkonzentration [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]
$V_{\text{max}}$ :	max. Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese

### 8.2 Technische Daten

#### Technische Daten des UV/VIS Spektralphotometers (550SE) der Firma PERKIN-ELMER:

Messprinzip:	Registrierendes UV/VIS-Zweistrahlspektrometer
Monochromator:	Littrow-Gitteranordnung mit holografischem Gitter, 1440 Linien/mm
Lichtquellen:	Deuteriumlampe und Halogenlampe, vorjustiert
Detektor:	Photomultiplier; RCA 1P 28A (195 – 750 nm) oder R446 (195 – 900 nm)
Datenausgänge:	Schreiber 1 V für 100 %T und 1 A; BCD (wahlweise), TTL-Pegel
Umgebungstemperaturbereich	15 bis 35°C
Wellenlängenmessbereich	190 bis 750 nm 190 bis 900 nm
Wellenlängenanzeige	vierstellig digital
Wellenlängengenauigkeit	$\pm 0,5$ nm
Wellenlängenreproduzierbarkeit	$\pm 0,2$ nm

Photometrischer Messbereich	-3 bis +3A
Spektrale Bandbreite	1 nm oder 2 nm
Photometrische Richtigkeit	$\pm 0,005$ A bei A = 1
Photometrische Reproduzierbarkeit	$\pm 0,0005$ A bei A = 1
Stabilität	$\pm 0,001$ A/h nach Aufwärmphase
Abweichung Basislinie	$\pm 0,001$ A von 200 bis 800 nm
Registriereschwindigkeit	7,5; 15; 30; 60; 120, nm/min

### Technische Daten des UV/VIS Spektralphotometers (SPECORD 40) der Firma JENA ANALYTIKER:

Messprinzip:	Sequentiell messendes Einstrahlphotometer mit großflächiger Photodiode
Optik:	Monochromator mit holografischem Konkavgitter
Strahlungsquellen:	Deuteriumlampe und Halogenlampe, vorjustiert
Wellenlängenmessbereich;	190 bis 1100 nm
Photometrischer Messbereich:	-3 bis +3A
Wellenlängengerichtigkeit:	$\pm 0,3$ nm im Bereich 190 - 1100 nm
Wellenlängenreproduzierbarkeit:	$\pm 0,1$ nm (5 Messungen)
Streulicht	< 0,8 % T bei 200 nm (KCl) < 0,03 % T bei 220 nm (NaJ, ASTM) < 0,03 % T bei 340 nm (NaNO <sub>2</sub> , ASTM)
Spektrale Bandbreite:	1,3 nm bei 500 nm
Photometrische Richtigkeit:	$\pm 0,004$ A bei A = 1
Photometrische Reproduzierbarkeit:	$\pm 0,0005$ A bei A = 1
Stabilität:	$\pm 0,001$ A/h bei 500 nm (1 h Einlaufzeit)
Abweichung Basislinie:	$\pm 0,001$ A von 200 bis 800 nm
Registriereschwindigkeit:	30, 60, 120, 300, 600, 1200, 3000, 6000 nm/min





## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.-D. Vorlop für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Insbesondere sein ständiges Interesse an der praktischen Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine guten Ideen waren ein wichtiger Grundstein dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. S. Lang danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr. H. Gröger bedanke ich mich für die enge und ausgezeichnete fachliche Zusammenarbeit sowie für die zahlreichen und in jeder Hinsicht anregenden Diskussionen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch den vielen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für Technologie der FAL Braunschweig für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima aussprechen. In einzelnen bedanke ich mich bei Frau Dr. V. Alm, Herrn Dr. U. Prüße, Herrn Dr. U. Jahnz und Frau K. Tamoschat.

Außerdem danke ich Frau Dr. A. Wiegand und Herrn Dr. R. Wegener für die Unterstützung.

Der Degussa AG danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Bei Herrn Dipl. Ing. C.P. Tietjen möchte ich mich für sein Verständnis, seine Geduld und seine Unterstützung bedanken.

Meinen Eltern und meinem Bruder Mehmet danke ich für die Wegbereitung, die mir all dies erst ermöglicht hat.